ZUR HERSTELLUNG UND REGENERATION VON HEFEPROTOPLASTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Majdi Shahin

aus Jerusalem

1970

ZUR HERSTELLUNG UND REGENERATION VON HEFEPROTOPLASTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Majdi Shahin

aus Jerusalem

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Professor Dr. W. Laskowski

2. Referent: Professor Dr. H. Lüers

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 1969

Tag der Promotion:

16. FEB. 1970

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL, METHODIK UND TECHNIK DER UNTERSUCHUNGEN	5
2.1 Saccharomyces-Stämme	5
2.2 Nährmedium	5
2.3 Herstellung von Hefeprotoplasten	6
2.3.1 Verwendete Kulturen	6
2.3.1.1 Variationen des Alters der Vor- und Hauptkultur	9
2.3.1.2 Bestimmung des Zelltiters	9
2.3.1.3 Messung des Wachstumsverlaufs	9
2.3.1.4 Bestimmung des pH-Wertes	10
2.3.1.5 Verwendete Puffer	10
2.3.2 Lösungen, die auf ihre Fähigkeit zur Stabilisation von Protoplasten untersucht worden sind (Stabilisatoren)	11
2.4 Regeneration von Protoplasten	12
2.4.1 Verwendetes Nährmedium	12
2.4.2 Vorbereitende Behandlung der Protoplasten	12
2.5 Aufnahmen und Objektzubereitung	13
3. ERGEBNISSE	14
3.1 Entstehung von Protoplasten	14
3.1.1 Magnesium- und Ammoniumsulfat als Stabilisatoren	14

Seite

3.1.2 Einfluß von Enzymkonzentrationen auf die Bildung von Protoplasten 18

3.1.3 Einwirkung des Enzyms auf die Entstehung von Protoplasten in Abhängigkeit von der Zeit 23

3.1.4 Einwirkung des Enzyms auf die Protoplastenbildung in Abhängigkeit von der Temperatur: 20, 25, 30 und 35 °C 27

3.1.5 Einfluß der Vor- und Hauptkultur im Zusammenhang mit der log. Wachstumsphase 30

3.1.5.1 Einfluß von Glucose und Aethanol auf die Protoplastenbildung 37

3.1.5.2 Protoplastenbildungsfähigkeit nach der Unterbrechung des Stoffwechsels 40

3.1.5.3 Einfluß des pH-Wertes 42

3.2 Haltbarkeit der Protoplasten 43

3.3 Regeneration von Protoplasten 44

3.3.1 Unterschiedliche Entwicklung der Protoplasten 45

3.3.1.1 Einfluß von Gelatinekonzentrationen und Bebrütungstemperaturen 56

3.3.1.1.1 Ermittlung des Prozentsatzes der Protoplasten, die zur Bildung von Kolonien fähig sind, anhand eines vereinfachten praktischen Beispiels 60

3.3.1.1.2 Lösungsmittel für die Gelatine 62

Seite

3.3.1.2 Einfluß der Vor- und Hauptkultur im Zusammenhang mit der log. Wachstumsphase 63

3.3.2 Empfindlichkeit der wachsenden Protoplasten 64

4. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN 66

4.1 Die Stabilisatoren 66

4.2 Die Enzymkonzentration und deren Einwirkungsdauer 68

4.3 Der Einfluß der Temperatur 70

4.4 Darstellung und Diskussion des Einflusses des Alters der Vor- und Hauptkultur im Zusammenhang mit der log. Wachstumsphase 71

4.5 Das Nährmedium 75

4.6 Protoplasten oder Sphäroplasten 77

4.7 Diskussion zur Regeneration von Protoplasten 78

5. ZUSAMMENFASSUNG 83

6. LITERATURVERZEICHNIS 85

Seite

1. EINLEITUNG

Die Gewinnung wandloser Hefezellen ist für die Erforschung physiologischer, biochemischer und genetischer (z.B. Transformations-Experimente) Vorgänge von großer Bedeutung.

Durch die bisher angewandte mechanische Zerstörung der Zellwand von Hefezellen war die Erforschung von Zellwandeigenschaften und Funktionen sowie die Isolierung eines intakten Zellinhaltes und die Untersuchung biochemischer Vorgänge weitgehend beeinträchtigt. Erst die enzymatische Zellwandablösung ermöglicht unter anderem eine günstigere Isolierung von intakter DNS (ROZIJN u. TONINO 1964, ROST u. VENNER 1964), von Zellkernen (ROZIJN u. TONINO 1964) und anderen Zellkomponenten (DUELL, INOUE u. UTTER 1964, OHNISHI u. HAGIHARA 1965, SUOMALAINEN, NURMINEN u. OURA 1966, RETEL u. PLANTA 1967) sowie die Erforschung des Stofftransportes (CIRILLO 1962, KOTYK 1965, BLOEMERS u. KONINGSBERGER 1967).

Bereits aus den Untersuchungen von GIAJA (1914, 1919 und 1922) ist bekannt, daß der Darmsaft der Weinbergschnecke Helix pomatia die Zellwand einiger Hefestämme auflösen kann. Die Untersuchungen von NORTHCOTE und HORNE (1952) sowie NORTHCOTE (1954) ergaben, daß die chemische Zusammensetzung der Zellwand hauptsächlich aus Mannan und Glucan besteht.

Nach den Angaben von FALCONE und NICKERSON (1956), KESSLER und NICKERSON (1959) sowie KORN und NORTHCOTE (1960) sind das Glucan und Mannan mit einem in der Zellwand vorhandenen Protein verbunden.

MILLBANK und MACRAE (1964) berichten, daß die Bildung von Protoplasten nur möglich sei, wenn das Glucan und Mannan der Zellwand mindestens teilweise vom Schneckenenzym degradiert werden, das Angreifen von Glucan allein sei nicht ausreichend.

Nach späteren Untersuchungen von ANDERSON und MILLBANK (1966) soll der Gehalt an Mannan bei Zellwänden, die sich gegenüber dem Schneckenenzym resistent verhielten, höher gewesen sein als bei denen, die angegriffen wurden. Auch soll sich das Mannan in den einzelnen Zellwänden in seiner Natur unterscheiden.
CHUNG und NICKERSON (1954) meinen, daß das Verhältnis zwischen Mannan und Glucan von den jeweiligen Wachstumsverhältnissen abhängig ist.

EDDY und WILLIAMSON (1957) erzielten unter Anwendung der von ihnen entwickelten Methode, bei der Rhamnose als Stabilisator verwendet wurde, Hefeprotoplasten von Saccharomyces cerevisiae und Saccharomyces carlsbergensis, sofern junge Zellen verwendet wurden.

ROST und VENNER (1964) stellten Hefeprotoplasten unter prinzipieller Anwendung der von EDDY und WILLIAMSON (1957) angegebenen Methode her und fanden unter anderem, daß die Ausbeute von Protoplasten aus Zellen verschiedener Stämme sich zwischen 1 - 100 % bewegt.
Zahlreiche Versuche vieler Untersucher, Protoplasten in kleinerer oder größerer Menge herzustellen, verlaufen jedoch nicht immer mit dem gewünschten Erfolg. Es erschien daher zweckmäßig, eingehende Untersuchungen über die

Faktoren anzustellen, die die Bildung von Hefeprotoplasten beeinflussen, und die Methode für eine optimale Gewinnung von Protoplasten in kleinerer oder größerer Menge zu erarbeiten. Dabei sollte auch geprüft werden, ob eine Protoplastenbildung bei isogenen Stämmen von verschiedenem Ploidiegrad (LASKOWSKI 1960 und 1962) in gleichem Ausmaß erzielt werden kann.

In Fortsetzung dieser Untersuchungen prüfte ich schließlich, ob die aus haploiden, diploiden und tetraploiden Stämmen hergestellten Protoplasten auch zur Regeneration fähig sind.

Bereits 1959 berichteten EDDY und WILLIAMSON, daß sich die Hefeprotoplasten in flüssigem Nährmedium unter Zunahme des Volumens zu unregulären Formen entwickeln können, ohne intakte Hefezellen zu bilden.
Die Untersuchungen von NECAS (1961) ergaben, daß Protoplasten in der Tat fähig sind, normale Hefezellen zu bilden; eine Regeneration zu vegetativen Zellen konnte jedoch nur bei einem höheren Gelatinegehalt beobachtet werden.

Ähnliche Resultate erzielten ROST und VENNER (1965), NECAS und SVOBODA (1965) und SVOBODA (1965); auch die Synthese der Zellwand bei der Regeneration von Protoplasten wurde von NECAS (1965), NECAS und SVOBODA (1965), NECAS und HAVELKOVA (1965) sowie KOPECKA, CTRTNICEK und NECAS (1965) beobachtet.
NECAS wies 1956a, 1959, 1960 und 1961 darauf hin, daß sich der Kern der Protoplasten bei der Regeneration teilen kann, und nur Protoplasten bzw.

Protoplastenteile, die einen Zellkern besitzen, zur Regeneration fähig sind.

Es ist wichtig darauf hinzuweisen, daß der Ausdruck "Protoplast" im allgemeinen nur auf Zellabkömmlinge angewendet wird, die keine Reste der Zellwand mehr enthalten, also nur von der Cytoplasmamembran, dem Plasmalemma, begrenzt werden. Kann das Vorhandensein von Resten der Zellwand nicht ausgeschlossen werden, spricht man häufig von "Sphäroplasten". Aber auch dieser Begriff ist berechtigter Kritik unterzogen worden (FREY-WYSSLING 1967). Protoplasten und Sphäroplasten, also Zellabkömmlinge, die völlig oder weitgehend frei von Zellwandmaterial sind, zeichnen sich durch eine gemeinsame Eigenschaft aus. Sie zerplatzen, wenn sie in Wasser suspendiert werden, und sind nur in Gegenwart geeigneter Salz- oder Zuckerlösungen (Stabilisatoren) für längere Zeit stabil zu halten.

Das Zerplatzen bei Wasserzusatz wird in den hier beschriebenen Versuchen als entscheidendes Kriterium gewählt. Diejenigen Zellabkömmlinge, die diese Eigenschaft erworben haben, werden als "Protoplasten" bezeichnet, ohne daß damit etwas über das Fehlen oder Vorhandensein von Zellwandresten ausgesagt werden soll.

Einen zusammenfassenden Überblick über die insbesondere in den letzten zehn Jahren durchgeführten Untersuchungen gab das Symposium über Hefeprotoplasten in Jena 1965.

2. MATERIAL, METHODIK UND TECHNIK DER UNTERSUCHUNGEN

2.1 Saccharomyces Stämme

Sämtliche Versuche wurden mit folgenden, weitestgehend isogenen und homozygoten Saccharomyces Stämmen durchgeführt, deren Aufbau und Eigenschaften von LASKOWSKI 1960 und 1962 beschrieben worden sind:

Stamm-Nr.	Ploidiegrad	Paarungstypallele
211-1b	haploid	a
211	diploid	aα
415	tetraploid	aa$\alpha\alpha$

Diese Stämme wurden in luftdicht verschraubbaren Schrägagarröhrchen mit Hefe-Extrakt-Medium als Stammkultur im Kühlraum bei ca. +4° C gehalten. Hiervon wurde in Abständen von 5 - 7 Monaten eine Oese auf frisches Nährmedium überimpft, anschließend im Brutraum bei 30 ° C 48 - 60 Stdn. bebrütet und wiederum im Kühlraum aufbewahrt.

Für die Durchführung der Versuche wurde der Stammkultur mit einer Oese eine Probe entnommen und in flüssiges Hefe-Extrakt-Medium übertragen.

2.2 Nährmedium

a) Hefe-Extrakt-Medium (HE-Medium): 1 % Hefeextrakt (Difco), 2 % Glucose, 0,5 % Pepton aus Fleisch (Merck), 2 % Agar, in 100 ml Aqua dest.

b) Flüssiges Hefe-Extrakt-Medium (fl. HE-Medium): Hefe-Extrakt-Medium ohne Agar.

c) Flüssiges HE-Medium, das anstelle von bisher 2 % Glucose nur 0,125 % enthält.

d) Flüssiges HE-Medium mit 0,5 % Aethanol.

e) Flüssiges HE-Medium ohne Glucose, jedoch mit einem Zusatz von 0,5 % Aethanol.

Das Nährmedium wurde in verschlossenen Reagenzgläsern und Erlen-Meyer-Kolben bei 123 °C für 30 Min. im Autoklaven sterilisiert und nach dem Abkühlen im Kühlraum bei +4 °C aufbewahrt.

2.3 Herstellung von Hefeprotoplasten

Im folgenden wird die zur Herstellung von Protoplasten angewandte Methode dargestellt.

Zuvor empfiehlt es sich, die benötigten Kulturen kurz zu definieren, da die Kenntnis von deren Bedeutung wesentlich zum Verständnis der weiteren Darstellung der Methode beiträgt.

2.3.1 Verwendete Kulturen

Vor-Vorkultur: Die Vor-Vorkultur wird als Ausgangsmaterial für die Vorkultur zur Herstellung großer Mengen von Protoplasten benötigt.

Vorkultur: Die Vorkultur wiederum ist als Ausgangsmaterial für die Hauptkultur

zur Herstellung kleiner und großer Mengen von Protoplasten erforderlich. Wie im Abschnitt Ergebnisse gezeigt werden wird, hat das Alter der Vorkultur einen wesentlichen Einfluß auf die Protoplastenbildung in der Hauptkultur.

Hauptkultur: Zellen der Hauptkultur werden unmittelbar zur Herstellung von Protoplasten in beliebigen Mengen verwendet.

A. Protoplastenherstellung in kleinen Mengen

Vorkultur: Eine kleine Zellmenge der Stammkultur wurde mit einer Platinöse in 7 ml fl. HE-Medium überimpft und 12 Stdn. bei 30 °C im Brutraum unter Schütteln inkubiert (nach 10 Stdn. Übergang von der log. zur stationären Phase).

Hauptkultur: Es wurden 0,03 - 0,1 ml von Zellen der Vorkultur aufgenommen und in 7 ml fl. HE-Medium übertragen, bei 30 °C unter Schütteln 6 Stdn. inkubiert (Extinktion = 0,3), geerntet, 3 mal mit Aqua dest. gewaschen und in 0,05 m Citratphosphatpuffer (pH = 6,0) suspendiert. 0,8 ml dieser Hefezellsuspension wurden 2 ml $MgSO_4$ (0,8 m) als Stabilisator und 0,2 ml = 2,66 % Schneckenenzym zugesetzt und anschließend gut gemischt.

Das für die Zellwandablösung benötigte Enzym von Helix pomatia wurde in Ampullen von L'Industrie Biologique Francaise, 35 - 49 Quai du Moulin de Cage, Gennevilliers, Seine, Frankreich, bezogen. Jede Ampulle enthält 1 ml Schneckenenzym, das als 100 %iges Konzentrat betrachtet wurde.
Die behandelten Zellen, die sich in 50 ml fassenden Kolben befanden, wurden 2,5 Stdn. bei 25 °C im Brutschrank bebrütet. Der Zelltiter betrug 10^7 - $3 . 10^7$/ ml und konnte bis zu $2 . 10^8$ / ml ansteigen, ohne eine Änderung der Schnecken-

enzymkonzentration erforderlich zu machen.

B. Protoplastenherstellung in großen Mengen

Sollen große Mengen von Protoplasten hergestellt werden, ist folgendermaßen zu verfahren:

Vor-Vorkultur: Eine kleine Zellmenge der Stammkultur ist in ein mit 7 ml. fl. HE-Medium gefülltes Reagenzglas zu überimpfen und 12-24 Stdn. bei 30 °C im Brutraum unter Schütteln zu inkubieren.

Vorkultur: Es sind 0,1 ml von Zellen der Vor-Vorkultur aufzunehmen und im Verhältnis 1:10 zu verdünnen; davon 0,2 ml in 65 ml fl.HE-Medium zu übertragen und bei 30 °C unter Schütteln 11 - 12 Stdn. zu inkubieren, wobei die Extinktion 0,3 nicht überschreiten darf.

Hauptkultur: Die Zellen der Vorkultur (65 ml) sind aufzunehmen und in 1 l Nährmedium zu übertragen (Anfangsext. = ca. 0,03), bei 30 °C unter Schütteln 4,5 - 5 Stdn. zu inkubieren (Ext.wiederum 0,3), zu ernten, 3 mal mit Aqua dest. zu waschen und in 100 ml 0,05 m Citratphosphatpuffer zu suspendieren. 100 ml dieser Hefezellsuspension sind 250 ml 0,8 m $MgSO_4$ als Stabilisator und 9 Ampullen = 2,5 % Schneckenenzym zuzusetzen und gut zu vermengen.

Die behandelten Zellen, die sich in 1000 ml fassenden Erlen-Meyer-Kolben befinden, sind 2,5 Stdn. bei 25 °C im Brutschrank zu inkubieren. Der Zelltiter hat hierbei ca. $1,6 \cdot 10^8$ / ml zu betragen.

Zur Herstellung einer noch größeren Menge Protoplasten sind z.B. anstelle

von 1 l Nährmedium 2 l zu verwenden, hierbei ist die Hauptkultur nicht 4,5 - 5 Stdn., sondern 6 - 6,5 Stdn. (Extinktion ca. 0,3) zu inkubieren. Bei Verwendung von zwei Litern Nährmedium sind der Hefezellsuspension von 200 ml der Stabilisator mit 500 ml und die Schneckenenzymkonzentration mit 18 Ampullen = 2,5 % zuzugeben.

2.3.1.1 Variationen des Alters der Vor- und Hauptkultur

Für die Experimente zur Bestimmung des Einflusses des Alters der Vorkultur und das der Hauptkultur auf die Bildung von Protoplasten wurde die Vorkultur (A) bis 108 Stdn. bebrütet. Von der Vorkultur wurde dann in Zeitintervallen von 12, 36, 60, 80 und 108 Stdn. kleine Mengen als Anfangstiter aufgenommen und in 7 ml frisches fl. HE-Medium übertragen (Anfangsext. = 0,025 - 0,035). Zellen der Hauptkultur wurden jeweils nach 4 (Ext. = 0,12 - 0,15), 6 (Ext. = 0,3 - 0,45) und 8 Stdn. (Ext. = 0,7 - 0,8) geerntet.
Bei einigen Versuchen wurde die log. Wachstumsphase durch die Zugabe einer geringeren Anzahl von Zellen und einer größeren Menge Nährmedium verlängert.

2.3.1.2 Bestimmung des Zelltiters

Um den Zelltiter zu bestimmen, wurden der Zellsuspension Proben entnommen und die Zellzahl mit Hilfe der Zählkammer nach Bürker-Türk mikroskopisch festgestellt.

2.3.1.3 Messung des Wachstumsverlaufs

Die Zellen der jeweiligen Stämme wurden in Reagenzgläser mit 7 ml fl. HE-

Medium überimpft und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Das Wachstum wurde dann in Abständen von jeweils einer Std. durch Messung der Trübung festgestellt. Diese Trübung wurde mit Hilfe der Extinktion in einem Lange-Kolorimeter mit Grünfilter bei 500 - 570 nm gemessen.
Um eine Eichkurve für die Zellzahl in Abhängigkeit von der Extinktion herzustellen, wurden gleichzeitig in Abständen von einer Std. Proben entnommen und die Zellzahl, wie bei der Bestimmung des Zelltiters, festgestellt (Abb. 1).

2.3.1.4 Bestimmung des pH-Wertes

In einem über 100 Stdn. dauernden Wachstumsverlauf (Bebrütungszeit) der Vorkultur (nach 10 Stdn. Übergang von der log. zur stationären Phase) und in einem 4 Stdn. dauernden Wachstumsverlauf der Hauptkultur (log. Wachstumsphase) wurde der pH-Wert mit Hilfe verschiedener Lackmuspapier-Arten[1] bestimmt.

2.3.1.5 Verwendete Puffer

a) Bei allen Verdünnungsschritten wurde ein m/20 KH_2PO_4 Puffer verwendet.

b) 0,05 m Citratphosphatpuffer wurde für die Herstellung von Protoplasten benutzt.

---

1) Lackmuspapier: a. Universal-Indikatorpapier, Merck AG, Darmstadt
b. Lyphan Lackmuspapier, Kloz, Berlin-Neukölln.

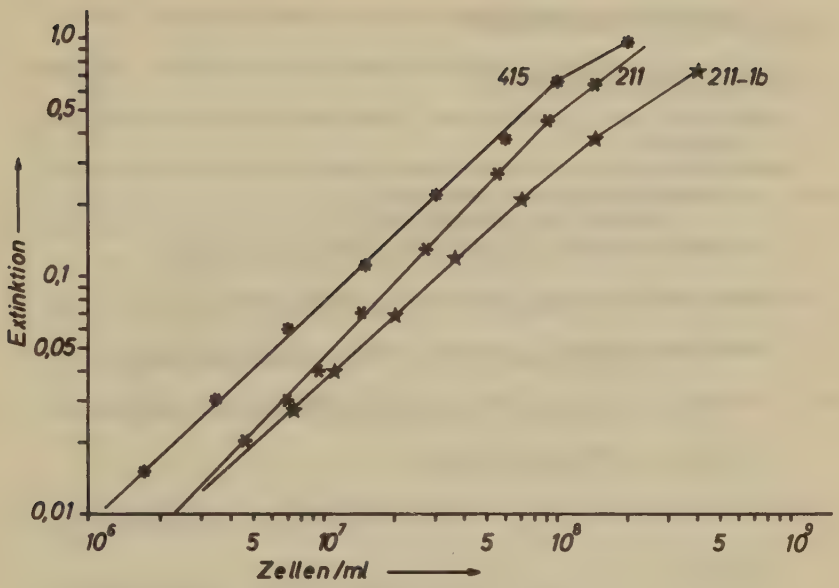

Abb. 1: Eichkurve für die Zellzahl in Abhängigkeit von der Extinktion in flüssigem Hefe-Extrakt-Medium für die haploiden (211 - 1b), diploiden (211) und tetraploiden (415) Stämme.

2.3.2 Lösungen, die auf ihre Fähigkeit zur Stabilisation von Protoplasten untersucht worden sind (Stabilisatoren)

KCl	0,2 - 0,6 m
NaCl	0,2 - 0,6 m
$(NH_4)_2SO_4$	0,1 - 1,2 m
$MgSO_4$	0,4 - 1,4 m
Mannit	10 %

2.4 Regeneration von Protoplasten

2.4.1 Verwendetes Nährmedium

a) HE-Medium

b) HE-Medium ohne Agar (fl.HE-Medium)

c) HE-Medium ohne Agar, gelöst in 0,6 m $(NH_4)_2SO_4$-Lösung

d) HE-Medium ohne Agar, gelöst in 1,2 m $MgSO_4$-Lösung

e) HE-Medium ohne Agar mit 10 %iger Gelatine, gelöst in Wasser

f) HE-Medium ohne Agar mit jeweils 10, 20, 30 und 40 %iger Gelatine in 0,6 m $(NH_4)_2SO_4$-Lösung

g) HE-Medium ohne Agar mit 10 %iger Gelatine in 1,2 m $(NH_4)_2SO_4$-Lösung

h) HE-Medium ohne Agar mit jeweils 10 und 20 %iger Gelatine in 1,2 m $MgSO_4$-Lösung

Nachdem das Nährmedium in Erlen-Meyer-Kolben bei 123 °C 30 Min. im Autoklaven sterilisiert worden war, wurde es in Petrischalen und 50 ml fassende Kolben gegossen und aufbewahrt.

2.4.2 Vorbereitende Behandlung der Protoplasten

Die Protoplasten wurden nach der auf Seite 7 beschriebenen Methode hergestellt.

Durch Zentrifugation wurden die Protoplasten vom Schneckenenzym isoliert, einmal mit 1,2 m $MgSO_4$ gewaschen und abzentrifugiert, wobei die Zentrifugalgeschwindigkeit 2000 U/Min. nicht überschreiten durfte (Radius etwa

5,5 cm). Im Anschluß daran wurde 1,2 m $MgSO_4$-Lösung als Stabilisator zugegeben. Ohne Verdünnung wurden 0,5 ml dieser Protoplastensuspension in die einzelnen 50 ml fassenden Kolben, die jeweils 10 - 12 ml Nährmedium verschiedener Gelatinekonzentrationen enthielten, für mikroskopische Beobachtungen (s. 2.5) der einzelnen Entwicklungsstadien übertragen.

Für quantitative Untersuchungen wurde die Suspension entsprechend verdünnt, auf in Petrischalen ausgegossenes Nährmedium ohne Spatel verteilt und bei 25 und 30 °C im Brutschrank 4 Tage inkubiert.

2.5 Aufnahmen und Objektzubereitung

Sämtliche Bilder von Hefezellen und Protoplasten wurden mit dem Ortholux Mikroskop (Firma Leitz) und der Phasenkontrast-Einrichtung mit Kondensor nach Heine aufgenommen. Außerdem wurden Filmaufnahmen mit einer Bolex-Kamera (Bolex H16 Reflex) über die Entstehung und Keimung von Protoplasten (Zeitrafferaufnahmen) sowie über das Platzen von Protoplasten nach Zusatz von Wasser durchgeführt.

Objektzubereitung: 40 %ige Gelatinekonzentration wurde als dünner Film auf den Objektträger aufgetragen, anschließend die vorbereitete Hefezellsuspension oder die Protoplasten tropfenweise darauf gebracht und mit einem Glasplättchen (Deckglas) abgedeckt.

Objektzubereitung für wachsende Protoplasten: Die Protoplasten wurden nach der bereits unter 2.4.2 geschilderten Behandlung mit dem Nährmedium auf den Objektträger aufgetragen, mit einem Glasplättchen abgedeckt und Paraffin abgedichtet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Entstehung von Protoplasten

Die im vorangegangenen Kapitel geschilderten Methoden zur Herstellung von Protoplasten sind nur einige von zahlreichen anderen Möglichkeiten. Um eine geeignete Methode zur Herstellung von Hefeprotoplasten zu erarbeiten, ist eine genaue Kenntnis der die Protoplastenbildung entscheidend beeinflussenden Faktoren von großer Bedeutung. Im folgenden werde ich den Einfluß einer Anzahl wesentlicher Faktoren und die Auswirkungen bestimmter Variationen dieser Faktoren schildern.

Besonders berücksichtigt wird dabei die Auswahl eines geeigneten Stabilisators, der Einfluß der Enzymkonzentration, Enzymeinwirkungszeit und Temperaturabhängigkeit der Enzymeinwirkung sowie die Stoffwechsellage der Zellen. Für die Versuche wurden ein haploider, ein diploider und ein tetraploider Saccharomyces-Stamm verwendet.

Grundsätzliche Differenzen in der Protoplastenbildung traten bei diesen Stämmen nicht auf. Wenn im Text oder in den Abbildungslegenden der Ploidiegrad nicht angegeben ist, wurden die Versuche mit dem diploiden Stamm 211 durchgeführt.

3.1.1 Magnesium- und Ammoniumsulfat als Stabilisatoren

Um während und nach dem enzymatischen Abbau der Hefezellwand eine Lyse der Protoplasten zu verhindern, war es erforderlich, einen geeigneten Stabilisator zu ermitteln.

Zunächst wurden Mannit, KCl, NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ auf ihre Fähigkeit zur Stabilisation untersucht. Dabei bewirkten jeweils Mannit, KCl und NaCl keine ausreichende Stabilisation. Die meisten Zellen platzten während der Enzymeinwirkung an einer Stelle,ohne Protoplasten zu bilden. Im Gegensatz hierzu wurden die Protoplasten durch $(NH_4)_2SO_4$ stabilisiert. Im Verlauf der mit $(NH_4)_2SO_4$ durchgeführten Untersuchungen wurde jedoch bei den Kontrollen wiederholt festgestellt, daß die Fähigkeit der Zellen, Kolonien zu bilden, weitgehend beeinträchtigt war. Diese Beobachtungen machten eine eingehende Prüfung des Einflusses von $(NH_4)_2SO_4$ auf die Koloniebildungsfähigkeit der aus der log. Wachstumsphase stammenden Zellen erforderlich. Dazu wurden Zellen des diploiden (Extinktion nach 6 Stdn. = 0,3) sowie des tetraploiden (Extinktion nach 6 Stdn. = 0,23) Stammes aus der log. Wachstumsphase der Hauptkultur geerntet, 3 mal gewaschen und in Citratphosphatpuffer suspendiert, anschließend wurde $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 - 0,6 m im Verhältnis 2,2 : 0,8 [2)] der Hefezellsuspension zugegeben, 2,5 Stdn. bei 25 °C inkubiert, dann auf HE-Medium ausgestrichen und bei 30°C für 4 Tage bebrütet. Es zeigte sich, daß die Zellen bei der Endkonzentration von 0,4 m, die auch zur Herstellung von Protoplasten verwendet wurde, nur bis zu einem Drittel zur Kolonienbildung fähig waren.

---

2) Berechnung der Molarität: Die molare Endkonzentration y wurde nach der Gleichung $\frac{2,2 \cdot x}{3} = y$ ermittelt, dabei ist x die zugegebene molare Lösung.
Wurden beispielsweise 0,6 m zugegeben, ist die ermittelte molare Endkonzentration $\frac{2,2 \cdot 0,6}{3} = 0,44 = y$.
2,2 = in ml. zugegebene Menge an $(NH_4)_2SO_4$,
$\frac{0,8}{3,0}$ = Hefezellsuspension in ml.

In Abb. 2 sind die Resultate der durchgeführten Untersuchungen für den diploiden und den tetraploiden Stamm graphisch dargestellt. Der das Koloniebildungsvermögen hemmende Einfluß des Ammoniumsulfats ist deutlich erkennbar. Bei einer Endkonzentration von 0,44 m $(NH_4)_2SO_4$ bilden nur noch 31 % der Zellen des tetraploiden und 32 % des diploiden Stammes Kolonien.

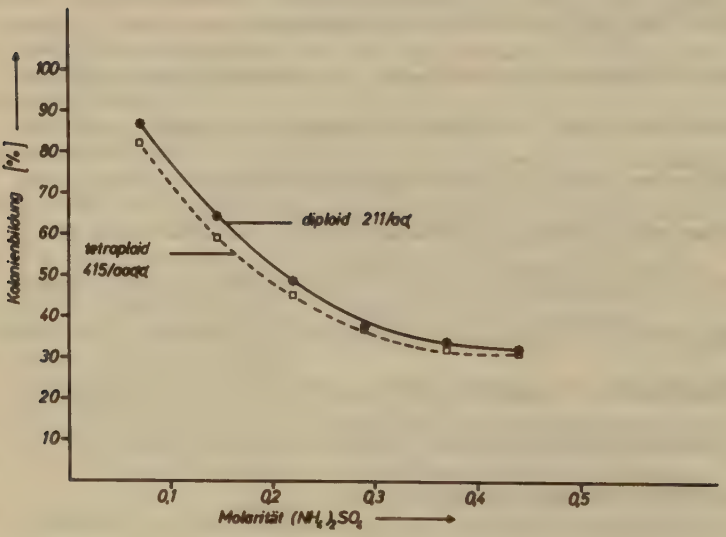

Abb. 2: Einfluß von $(NH_4)_2SO_4$ auf die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen des diploiden und tetraploiden Stammes, die aus der log. Wachstumsphase der Hauptkultur geerntet wurden.

Im Gegensatz hierzu wurde bei gleichartig behandelten Zellen aus der stationären Wachstumsphase eine Koloniebildungsfähigkeit von 87 % ermittelt.
Da in den später zu schildernden Regenerationsversuchen Protoplasten auf ein festes Nährmedium gebracht werden, das eine geeignete Konzentration an Stabilisator enthält, erschien es wichtig, auch den Einfluß des Stabilisators in festem Nährmedium auf das Koloniebildungsvermögen vegetativer Zellen zu überprüfen. Im Gegensatz zu den obigen Versuchen wurden die Zellen also nicht für 2,5 Stdn. in Puffer und Stabilisator suspendiert, sondern auf $(NH_4)_2SO_4$-Nähragar ausgeplattet und für 4 Tage bebrütet. Da sich in obigen Versuchen eine unterschiedliche Empfindlichkeit für Zellen aus der log. bzw. stationären Wachstumsphase ergeben hat, wurden diese Versuche ebenfalls vergleichend mit Zellen aus beiden Wachstumsphasen durchgeführt.
Es zeigte sich, daß Zellen aus der log. Wachstumsphase, die unmittelbar verdünnt und auf festes HE-Medium, das in 0,6 m $(NH_4)_2SO_4$ gelöst war (Endkonzentration = 0,6 m), ausgespatelt wurden, bis zu 90 % Kolonien bildeten. Allerdings war der Koloniedurchmesser kleiner als bei Kontrollen auf HE-Medium, was wohl auf eine längere Zellgenerationszeit in Gegenwart von $(NH_4)_2SO_4$ zurückzuführen ist.
Bei Zellen aus der stationären Wachstumsphase wird die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien auf $(NH_4)_2SO_4$-haltigen Nährböden nicht beeinträchtigt.
Schließlich wurde auch die Koloniebildungsfähigkeit von Protoplasten in Gegenwart von $(NH_4)_2SO_4$ und anderen Stabilisatoren überprüft. Es zeigte sich, daß die Koloniebildungsfähigkeit von mit $(NH_4)_2SO_4$ stabilisierten Protoplasten geringer als bei Verwendung anderer Stabilisatoren war. Die höchsten

Prozentsätze an Koloniebildung wurden mit $MgSO_4$ erzielt. Während z.B. bei einer Bebrütungstemperatur von 30 °C und einer Gelatinekonzentration von 40 % mit $(NH_4)_2SO_4$ als Stabilisator nur bis zu 16 % der Protoplasten Kolonien bildeten, wurden mit $MgSO_4$ als Stabilisator 45 % erreicht. Es wurden hierbei jeweils Zellen mit einer 12-stündigen Vorkultur und einer 6-stündigen Hauptkultur (Ext. = 0,3) verwendet. Vergleichsweise sei auf die in Abb. 25 graphisch dargestellten Ergebnisse von Versuchen, bei denen ebenfalls $MgSO_4$ als Stabilisator - allerdings bei 25° C - verwendet wurden, hingewiesen.
Da $MgSO_4$ auch im Puffer keinen hemmenden Einfluß auf die Kolonienbildung von vegetativen haploiden, diploiden und tetraploiden Zellen aus der log. oder stationären Wachstumsphase zeigt, wurde es in einer Endkonzentration von 0,8 m bei allen weiteren Versuchen als Stabilisator verwendet.

3.1.2 Einfluß von Enzymkonzentrationen auf die Bildung von Protoplasten

Bei den Ermittlungen, welche Konzentration des Schneckenenzyms für die Herstellung von Protoplasten am günstigsten ist, zeigte sich regelmäßig eine starke Schädigung der verwendeten Zellen, sobald die Enzymkonzentration höher als 6 % war. Dann trat bereits etwa 15 Minuten nach dem Enzymzusatz der Zellinhalt durch ein in der Zellwand gebildetes Loch hinaus und schwamm als Masse ohne feste Form umher (Abb. 3 a - 3 b). Eine geringere Schädigung hinsichtlich des Umfangs und der Zahl der angegriffenen Zellen war bei geringeren Enzymkonzentrationen (5 % und 3,6 %) zu verzeichnen.
Versuche, durch Schütteln eine weitgehend gleichmäßige Verteilung des Schneckenenzyms und der Hefezellsuspension zu erreichen, mußten aufgegeben werden,

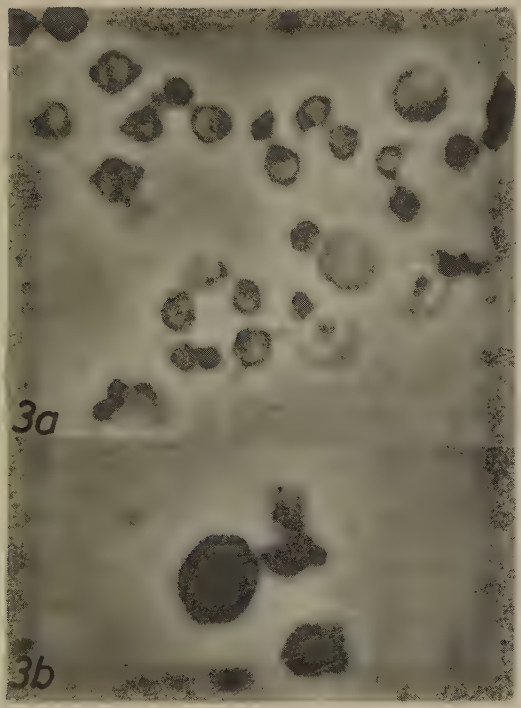

Abb. 3a - 3b: Hefezellen des diploiden Stammes, die aus der log. Wachstumsphase entnommen wurden. Schädigender Effekt nach 30 Min. Einwirken von 17 %igem Schneckenenzym.

da hierdurch, wie aus unzähligen kleinen Bruchteilen zu schließen war, eine noch größere Zerstörung bewirkt wurde.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die größere Wirkung des Schnekkenenzyms auf Hefezellen, die am Anfang der log. Wachstumsphase geerntet worden waren (z.B.: Alter der Vorkultur = 12 Stdn., davon 2 Stdn. Übergang zur stationären Phase; Extinktion der Hauptkultur nach 6 Stdn. = 0,1). Kugelige Formen der Protoplasten konnten bei diesen Enzymkonzentrationen nur selten

beobachtet werden. Der größte Teil aller Protoplasten platzte beim Ausschlüpfen. Erst nach Verringerung der Enzymkonzentration auf 2,66 % bildeten sich runde Protoplasten nach 2,5-stündigem Einwirken des Enzyms bei 25 °C (Abb. 4). Wurde die Enzymkonzentration weiter, d.h. auf 1,3 % verringert, war die Häufigkeit der Protoplastenbildung geringer und eine Erhöhung der Bebrütungszeit erforderlich.

Die Konzentration von 2,66 % erschien daher für die Durchführung der Versuche gut geeignet und wurde im folgenden stets verwendet. Das Auftreten runder Einheiten ist besonders in Kulturen langgestreckter Zellen, wie z.B. beim tetraploiden Stamm (vgl. Abb. 4 f und g), ein auffallendes Kennzeichen für das Vorhandensein von weitestgehend zellwandfreien Protoplasten. Sind die vegetativen Zellen aber ebenfalls rund, so ist eine Differenzierung zwischen beiden Zustandsformen auf Grund morphologischer Kriterien nicht so eindeutig möglich (vgl. Abb. 4a, b und c). Hier kann als einfach durchzuführender und eindeutiger Test das Zerplatzen zellwandfreier Einheiten bei Zusatz von Wasser dienen. Während vegetative Hefezellen unbeschadet in Wasser aufbewahrt werden können, zerplatzen Protoplasten bei Wasserzugabe (Verringerung der Stabilisatorkonzentration) (s. Abb. 5). Wegen der Eindeutigkeit dieses Kriteriums wurde der Wassertest für alle quantitativen Bestimmungen der Protoplastenbildungsfähigkeit aller Stämme angewendet. Wie bereits in der Einleitung betont wurde, wird in dieser Untersuchung nicht nachgeprüft, ob an den gebildeten Protoplasten noch Reste der Zellwand vorhanden sind. Das entscheidend hier verwendete Kriterium ist das Zerplatzen der nach Enzymeinwirkung entstandenen Einheiten nach Wasserzusatz. Diese runden Einheiten werden als "Protoplasten" bezeichnet.

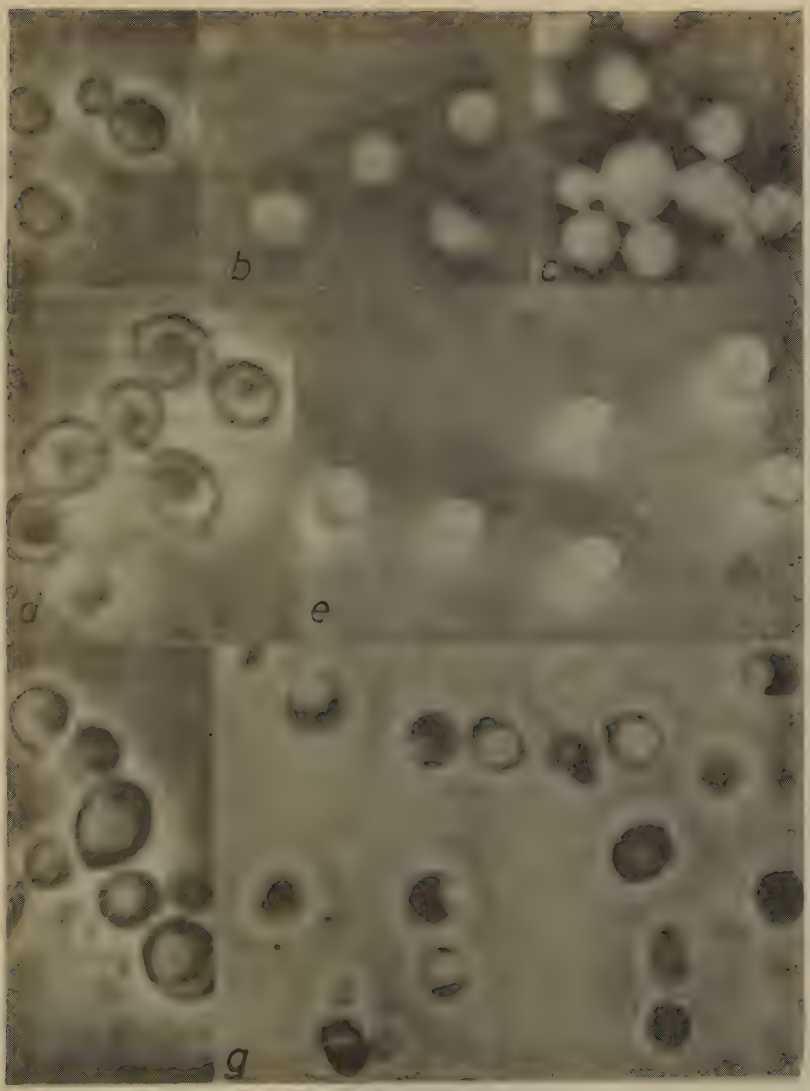

Abb. 4:
a) Normale Zellen des haploiden Stammes.
b) Protoplasten des haploiden Stammes.
c) Protoplasten des haploiden Stammes, die noch miteinander verbunden sind.
d) Normale Zellen des diploiden Stammes.
e) Protoplasten des diploiden Stammes.
f) Normale Zellen des tetraploiden Stammes.
g) Protoplasten des tetraploiden Stammes.

Die Protoplasten wurden nach 2,5-stündigem Einwirken einer 2,66 %-igen Schneckenenzymkonzentration bei 25°C aufgenommen.

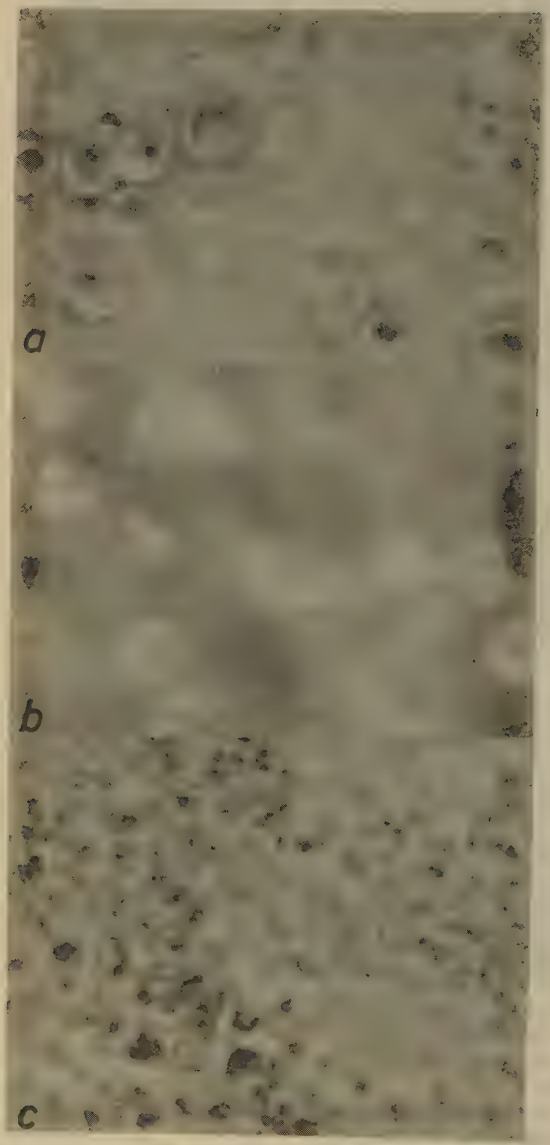

Abb. 5:

a. Protoplasten des diploiden Stammes unmittelbar nach der Zugabe von Wasser.

b. Geplatzte Protoplasten ca. 1 Min. nach der Zugabe von Wasser.

c. Protoplastenfragmente ca. 10 Min. nach starkem Schütteln mit Wasser.

3.1.3 Einwirkung des Enzyms auf die Entstehung von Protoplasten in Abhängigkeit von der Zeit

Um die Enzymeinwirkung in Abhängigkeit von der Zeit quantitativ zu bestimmen, wurden von den behandelten Zellen in Abständen von jeweils 30 Minuten Proben entnommen. Diese wurden nach der Zugabe von Wasser auf HE-Medium ausgespatelt. Parallel hierzu wurden die Zellen fortlaufend auf morphologische Änderungen mikroskopisch beobachtet.

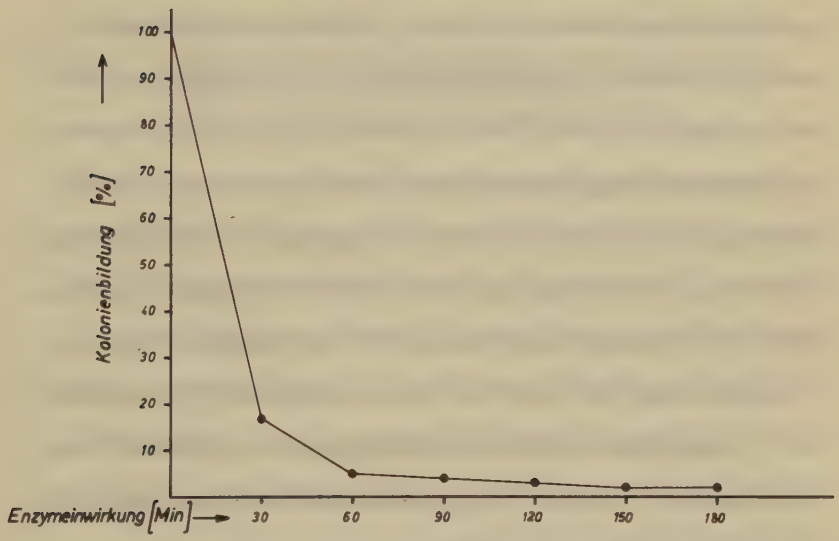

Abb. 6: Koloniebildungsfähigkeit des diploiden Stammes in Abhängigkeit von der Dauer der Enzymeinwirkung. Die Kolonienbildung wurde nach der Zugabe von Wasser ermittelt.

Aus Abb. 6 ist zu ersehen, daß bei dem diploiden Stamm nach 30 Minuten nur noch 17 % der Zellen zur Bildung von Kolonien fähig waren. Hieraus ist allerdings nicht zu folgern, daß sich nach 30 Minuten bereits 83 % runde Protoplasten gebildet haben, denn mikroskopische Beobachtungen haben gezeigt, daß für die Bildung eines maximalen Prozentsatzes an runden Protoplasten eine Einwirkungszeit von 150 Minuten erforderlich ist. Durch die Enzymeinwirkung wird innerhalb der ersten 30 Minuten die Zellwand an bestimmten, begrenzten Stellen (meistens den Zellpolen bei langgestreckten Zellen) aufgelöst, so daß bei der Zugabe von Wasser der Zelleib an diesen Stellen herausquellen und zerplatzen kann (vgl. Abb. 7). Bereits nach 60 Minuten der Einwirkung des Enzyms ist bei 95 % der Zellen eine Zellwandablösung erkennbar. Im Verlauf der nächsten 30 Minuten bilden sich einige runde Protoplasten. Die Protoplastenbildung steigert sich nunmehr erheblich; sie erreicht bei 120 Minuten ca. 30 - 40 % und überschreitet 95 % nach 150 - 180 Minuten Enzymeinwirkung. Die Auflösung der nunmehr von den Protoplasten getrennten Zellwände, die allerdings auch vereinzelt mit diesen lose verbunden bleiben, nimmt eine längere Zeit in Anspruch. Nach der Zugabe von Wasser war mikroskopisch ein allseitiges Vergrößern der Protoplasten und anschließendes Platzen zu beobachten. Die nach dem Platzen entstehenden Formen sind unterschiedlich, wie in Abb. 7 schematisch dargestellt ist.

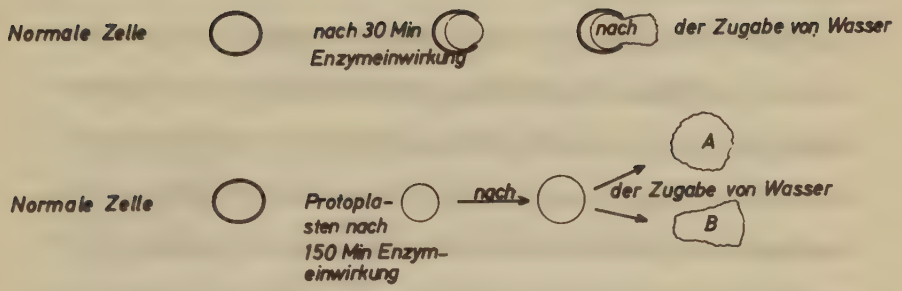

Abb. 7: Schematische Darstellung der Bildung von Protoplasten in Abhängigkeit von der Dauer der Enzymeinwirkung.
Platzen der Protoplasten nach der Zugabe von Wasser.

Die in Abb. 7 nach 150 Minuten Enzymeinwirkung zu beobachtende und mit A bezeichnete Form wird überwiegend und vor allem bei Verwendung jüngerer Vor- und Hauptkulturen gebildet (z.B.: Alter der Vorkultur = 12 Stdn., davon 2 Stdn. Übergang zur stationären Phase; Extinktion der Hauptkultur nach 4 Stdn. = 0,15, vgl. Kapitel 3.1.5). Diese in etwa runde Form ist nach der gleichmäßigen Vergrößerung und dem anschließenden Platzen der Protoplasten entstanden.
Im Gegensatz hierzu zeichnen sich die mit B gekennzeichneten Gebilde durch eine längliche Form aus, die auf ein einseitiges Platzen der Protoplasten nach der Vergrößerung zurückzuführen ist. Diese Beobachtungen wurden insbesondere bei der Verwendung älterer Vor- und Hauptkulturen gemacht (z.B.: Alter der Vorkultur = 60 Stdn., davon 20 Stdn. Übergang zur stationären Phase und 30 Stdn.

stationäre Phase; Extinktion der Hauptkultur nach 6 Stdn. = 0,45). Die Vermutung, daß die Form B auf das Vorhandensein von Zellwandresten zurückzuführen ist, wird in Kapitel 4 diskutiert.

Im Verlauf der Untersuchungen wurde mikroskopisch beobachtet, daß die Wände der Mutter- und Tochterzellen nicht immer gleichzeitig vom Schneckenenzym angegriffen werden. Entstammten die Zellen einer Hauptkultur, deren Extinktion nach 4 Stdn. z.B. 0,12 betrug, waren die Tochterzellen zuerst vom Schneckenenzym angreifbar. Hier sind die Wände der Tochterzellen dem Schneckenenzym gegenüber sensibler als die der Mutterzellen, die wiederum einer resistenten Zellgeneration entstammen. Mutter- und Tochterzellen wurden fast gleichzeitig vom Enzym angegriffen, sofern sie einer 6-stündigen Hauptkultur (Extinktion = 0,3) entnommen wurden. In dieser Wachstumsphase ist die Resistenz der Wände der Mutterzellen im Verlauf mehrerer Generationen soweit abgebaut worden, daß ihre Sensibilität gegenüber dem Schneckenenzym der der Tochterzellen vergleichbar ist. Ferner konnte bei Zellen,die einer 8 Stdn. alten Hauptkultur entstammten (Extinktion = 0,7), beobachtet werden, daß die Wände der Mutterzellen zuerst vom Schneckenenzym angegriffen wurden. Die Wände der Tochterzellen sind hier gegenüber der Schneckenenzymeinwirkung resistenter. Diese Resistenz ist auf den Verbrauch des Glucosegehaltes des Nährmediums in dieser Wachstumsphase zurückzuführen, wie später noch ausführlich berichtet wird.

Aus diesen Beobachtungen ist zu folgern, daß die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellwände gegenüber dem Schneckenenzym auf bestimmte Zellwandkomponenten zurückzuführen ist, wie auch aus den Befunden von ANDERSON u. MILLBANK (1966) sowie CHUNG u. NICKERSON (1954) entnommen werden

kann (s. Seite 2).

Weitere Untersuchungen (Kapitel 3.1.5 und 3.1.5.1) haben gezeigt, daß zwischen der Sensibilität der Zellwände gegenüber dem Schneckenenzym und dem Alter der Vor- und Hauptkultur in Verbindung mit der log. Wachstumsphase sowie dem Glucosegehalt des Nährmediums ein Zusammenhang besteht.

Wie ich schon erwähnte, wurden die Zellwände der von mir untersuchten Stämme meistens an einer bestimmten, begrenzten Stelle vom Schneckenenzym angegriffen und abgelöst. Lediglich die für Zellen des haploiden Stammes typische Klumpung erschwerte das Freisetzen der Protoplasten (Abb. 4c). Es ist nicht auszuschließen, daß einige Zellklumpen nicht nur durch die Zellwand miteinander verbunden sind, sondern auch durch das Plasmalemma. Hierdurch bedingt, könnte auch das Freisetzen der Protoplasten erschwert bzw. verhindert werden. Es ist jedoch auch möglich, daß diese Zellen gerade in dem Bereich der Zellwand miteinander verbunden sind, in dem sonst bei den Einzelzellen die Protoplasten auszutreten pflegen.

Daß auch die Zellwände der Zellklumpen (Abb. 4c) des haploiden Stammes weitgehend vom Schneckenenzym aufgelöst werden, bewies das für Protoplasten charakteristische Platzen nach der Zugabe von Wasser.

3.1.4 Einwirkung des Enzyms auf die Protoplastenbildung in Abhängigkeit von der Temperatur: 20, 25, 30 und 35 °C

Die Versuche wurden, wie in der Methodik unter 2.3.1 A-Hauptkultur beschrieben, durchgeführt, jedoch wurde die Temperatur während der Enzymeinwirkungszeit variiert. Nach 2,5-stündigem Inkubieren der Ansätze wurden

Proben entnommen, zentrifugiert, der Stabilisator beseitigt, Wasser zugegeben, geschüttelt und anschließend die Zahl der nicht geplatzten Zellen ermittelt. Dabei wiesen die einzelnen Proben denselben Prozentsatz an nicht geplatzten Zellen auf, so daß hierdurch ein Einfluß verschiedener Temperaturen nicht festgestellt werden konnte.

Wurden jedoch die runden Protoplasten unmittelbar nach der 2,5-stündigen Inkubationszeit gezählt, zeigte sich aufgrund der voneinander abweichenden Ergebnisse, daß die Einwirkung des Schneckenenzyms in Abhängigkeit von der Temperatur sehr unterschiedlich war (s. Abb. 8).

Bei den Temperaturen von 20 und 25 °C konnten wesentlich mehr runde Protoplasten beobachtet werden als bei 30 °C, bei 30 °C wiederum mehr als bei 35 °C.

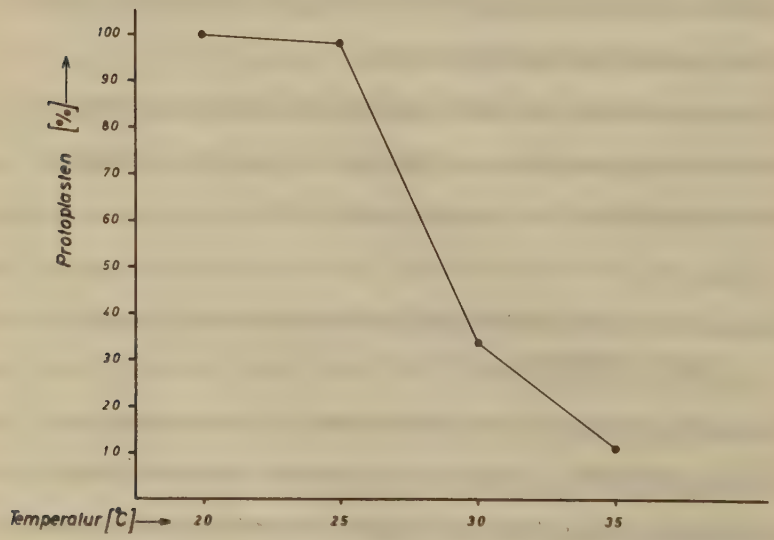

Abb. 8: Entstehung von Protoplasten nach 2,5 Stdn. Schneckenenzymeinwirkung in Abhängigkeit von der Temperatur.

Aus der Abb. 8 ist weiterhin zu ersehen, daß sich bei 35 °C nur noch 11 % runde Protoplasten gebildet hatten. Hier war die Enzymeinwirkung durch die Temperaturerhöhung offensichtlich so verstärkt worden, daß sich kaum noch Protoplasten entwickeln konnten; sie platzten größtenteils beim Heraustreten aus der Zellwand.

Eine niedrigere Enzymkonzentration von 1,3 % verursachte eine geringere Schädigung, die hierdurch erzielte Häufigkeit der Protoplastenbildung war verhältnismäßig gering.

3.1.5 Einfluß der Vor- und Hauptkultur im Zusammenhang mit der log. Wachstumsphase

Wie bereits die Beobachtungen in Abschnitt 3.1.3 andeuteten, beeinflußt das Alter der Vor- und Hauptkultur die Häufigkeit der Protoplastenbildung. Dieser Einfluß wird unter Berücksichtigung des Alters der Vorkultur bei konstantem Alter der Hauptkultur (4 Stdn.) in der graphischen Darstellung der Abb. 9 deutlich. Die größte Häufigkeit der Protoplastenbildung wurde mit einer 12-stündigen, die geringste mit einer 108-stündigen Vorkultur erzielt.

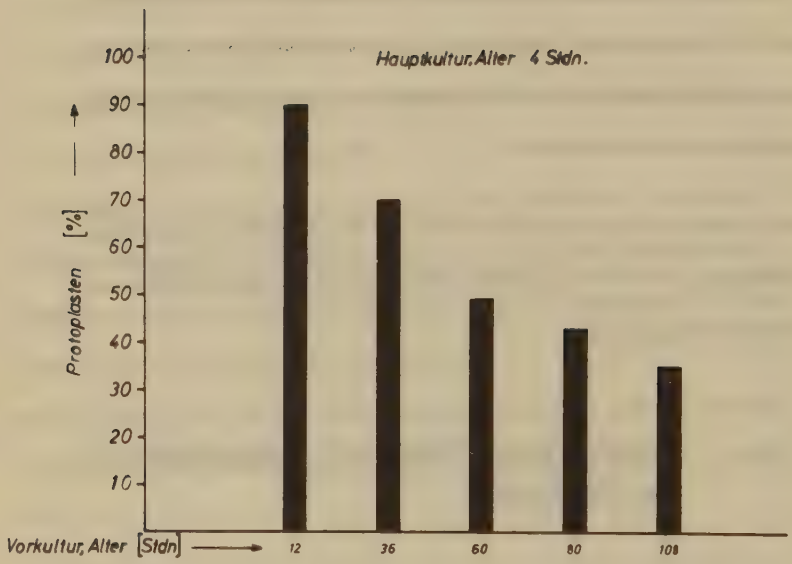

Abb. 9: Protoplastenbildung des diploiden Stammes nach 2,5 Stdn. Schneckenenzymeinwirkung in Abhängigkeit vom Alter der Vorkultur.

Für die Durchführung der Versuche, deren Ergebnis in Abb. 9 dargestellt ist, stammen die Zellen der Vorkultur sämtlich aus dem Bereich des Übergangs zur stationären Phase bzw. aus der stationären Wachstumsphase, deren Anfang, wie aus Abb. 10 erkennbar ist, mit einer Bebrütungszeit von 10 bzw. 30 Stdn. erreicht wird.

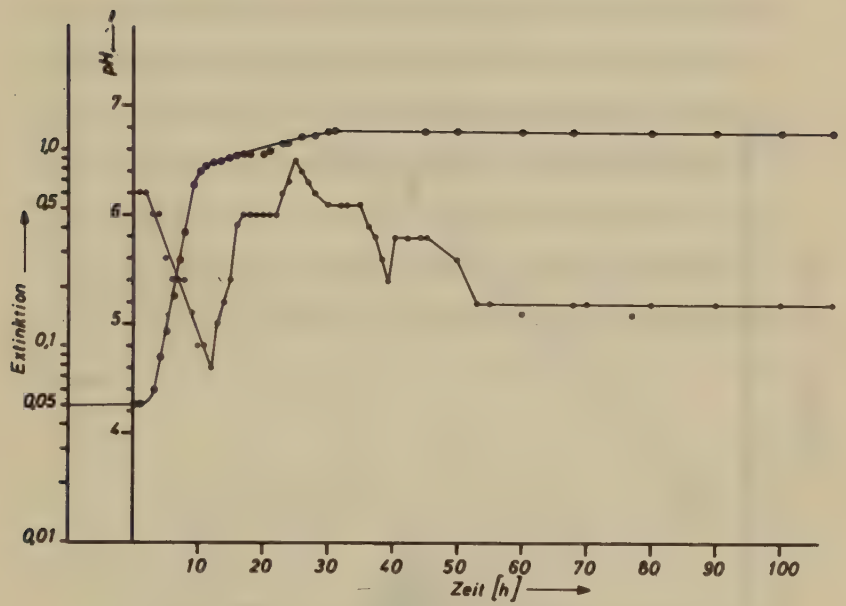

Abb. 10: Wachstumsverlauf des diploiden Stammes in flüssigem HE-Medium in 108 Stdn. pH-Wert während dieses Zeitraums.

Es beeinflußt jedoch nicht nur das Alter der Vorkultur, sondern auch das der Hauptkultur die Häufigkeit der Protoplastenbildung.

Abb. 11 zeigt eine Wachstumskurve der Hauptkultur mit dem Bereich der log. Wachstumsphase und den Übergang zur stationären Phase. Aus diesen Bereichen wurden jeweils nach 4 (Ext. = 0,12 - 0,15), 6 (Ext. = 0,3 - 0,45)

und 8 Stdn. (Ext. = 0,7 - 0,8) Zellen für die Untersuchungen entnommen.

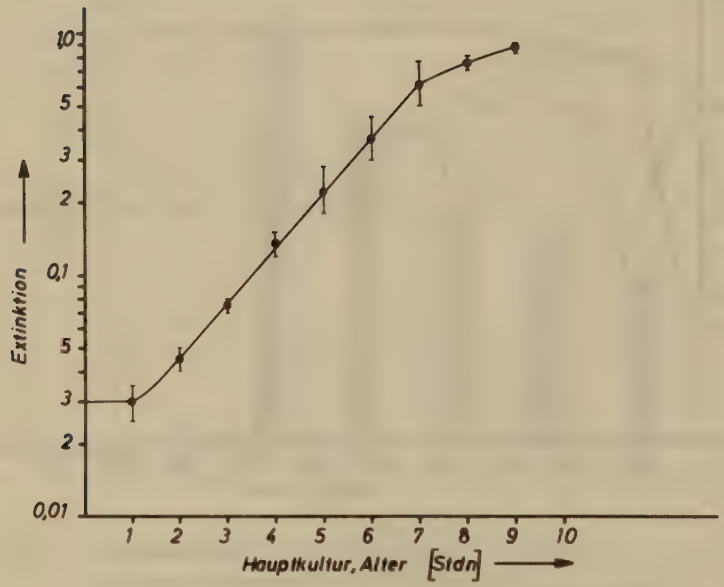

Abb. 11: Logarithmische Wachstumsphase und Übergang von der log. zur stationären Phase, aus der die Zellen nach jeweils 4, 6 und 8 Stdn. zur Herstellung von Protoplasten entnommen wurden (diploider Stamm).

Die Wachstumskurve in Abb. 10 zeigt einen deutlichen Knickpunkt im oberen Kurventeil kurz vor dem Eintreten in die stationäre Wachstumsphase.

Wie Untersuchungen von POHLIT, LASKOWSKI und LOCHMANN (1966) gezeigt haben, ist unter den gewählten Bedingungen an diesem Knickpunkt der Glucosegehalt des Mediums verbraucht. Für das restliche Wachstum verwenden die Zellen den in der ersten Wachstumsphase hergestellten Alkohol als Kohlenstoffquelle. Den nach 8 Stdn. entnommenen Zellen steht also im Gegensatz zu den nach 4 oder 6 Stdn. entnommenen Zellen keine Glucose im Nährmedium zur Verfügung. Über den Einfluß von Glucosemangel auf die Protoplastenbildung wird in Kapitel 3.1.5.1 noch eingehend berichtet.

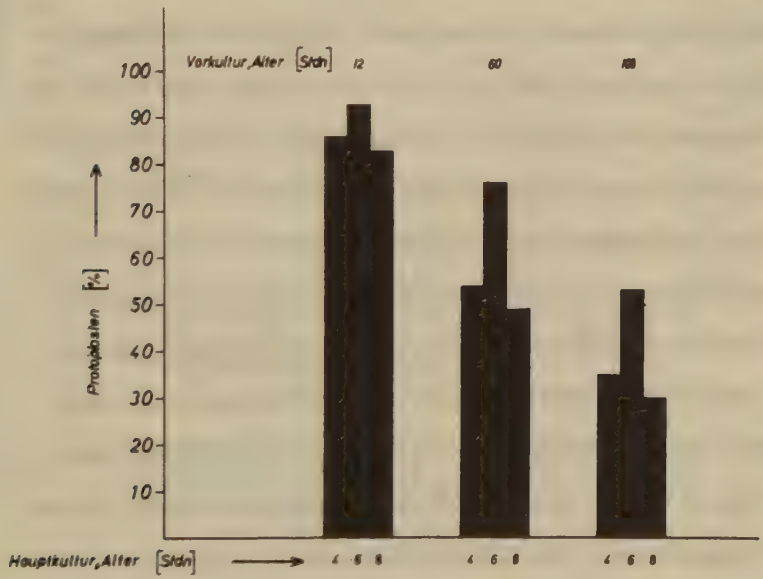

Abb. 12: Protoplastenbildung des diploiden Stammes nach 2,5 Stdn. Schneckenenzymeinwirkung in Abhängigkeit vom Alter der Vor- und Hauptkultur.

Wie aus Abb. 12 ersichtlich, wurde eine optimale Protoplastenbildung mit einer 12-stündigen Vorkultur und einer 6-stündigen Hauptkultur erreicht. Auch bei Verwendung von 60 und 108 Stunden alten Vorkulturen war festzustellen, daß sich die Häufigkeit der Protoplastenbildung zwischen der 4. und der 6. Stunde der Hauptkultur steigert, in der 6. Stunde ihren Höhepunkt erreicht und dann deutlich abnimmt. Nach 8 Stunden war sie regelmäßig geringer als nach 4 Stunden. Der Anstieg der Häufigkeit der Protoplastenbildung zwischen der 4. und 6. Stunde der Hauptkultur sowie deren Abfall zwischen der 6. und 8. Stunde war bei Verwendung einer 60-stündigen Vorkultur am größten.

Damit ist deutlich gezeigt, daß zwischen der Häufigkeit der Protoplastenbildung und dem Alter der Vor- und Hauptkultur ein Zusammenhang besteht. Wie vorstehenden Versuchsergebnissen und folgenden Berichten zu entnehmen ist, kann eine optimale Protoplastenbildung nur bei Verwendung von Zellen aus der log. Wachstumsphase der Hauptkultur erzielt werden. Es wurde daher untersucht, inwieweit sich eine Verlängerung der log. Wachstumsphase und damit eine Vermehrung der Zellgenerationen in der Hauptkultur - bisher bis zu 6 Stunden (4 Zellgenerationen), dann Beginn des Übergangs zur stationären Phase - auf die Häufigkeit der Protoplastenbildung auswirkt. Für die Durchführung der Versuche wurde eine 108-stündige Vorkultur verwendet, die nach 6-stündiger Hauptkultur zu 53 % Protoplasten führt (s. Abb. 12). Durch das Angebot von mehr fl. HE-Medium in der Hauptkultur (2 l im Gegensatz zu den sonst verwendeten 7 ml) kann bei gleicher Größe des Inokulats eine Verlängerung der log. Wachstumsphase und damit eine Vermehrung der Zellgene-

log. Wachstumsphase in der Hauptkultur bis 22 Stunden führte im Vergleich zu den bisher mit einer 108-stündigen Vorkultur erzielten Ergebnissen zu einem erheblich größeren Prozentsatz an Protoplasten. Wie aus der Abb. 13 entnommen werden kann, beträgt die Häufigkeit der Protoplastenbildung zwischen 18 und 23 Stdn. der Hauptkultur jeweils über 90 %.

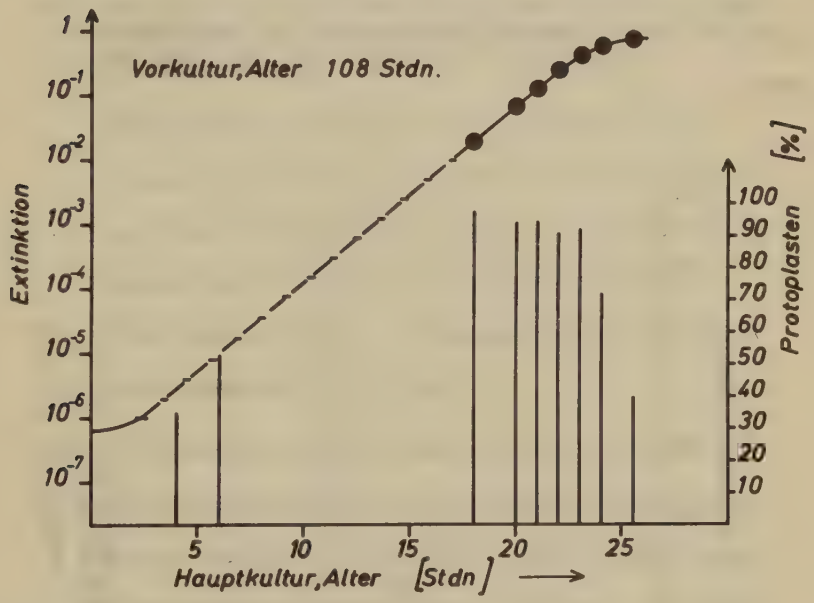

Abb. 13: Protoplastenbildung des diploiden Stammes nach 2,5 Stdn. Schneckenenzymeinwirkung in Abhängigkeit vom Alter der Vor- und Hauptkultur.

Um dieses Ergebnis noch einmal zu überprüfen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Es wurde von einer 6 Monate alten Stammkultur eine Zellprobe entnommen, in 5 ml Phosphatpuffer suspendiert, davon 0,1 ml in 2 l fl. HE-Medium übertragen und ca. 26 Stdn. bis zu einer Extinktion von 0,27

bei 30 °C im Brutraum unter Schütteln inkubiert, geerntet und die Protoplasten nach der beschriebenen Methode hergestellt.

Die Häufigkeit der Protoplastenbildung stieg unter diesen Bedingungen (Fehlen einer Vorkultur) auf 97 %, obwohl die Zellen einer 6 Monate alten Stammkultur entnommen waren. Eine Vorkultur ist jedoch nur dann nicht erforderlich, wenn die log. Wachstumsphase der Hauptkultur ausreichend verlängert wird (s. Abb. 14). Damit ist eindeutig die Bedeutung der log. Wachstumsphase bestätigt.

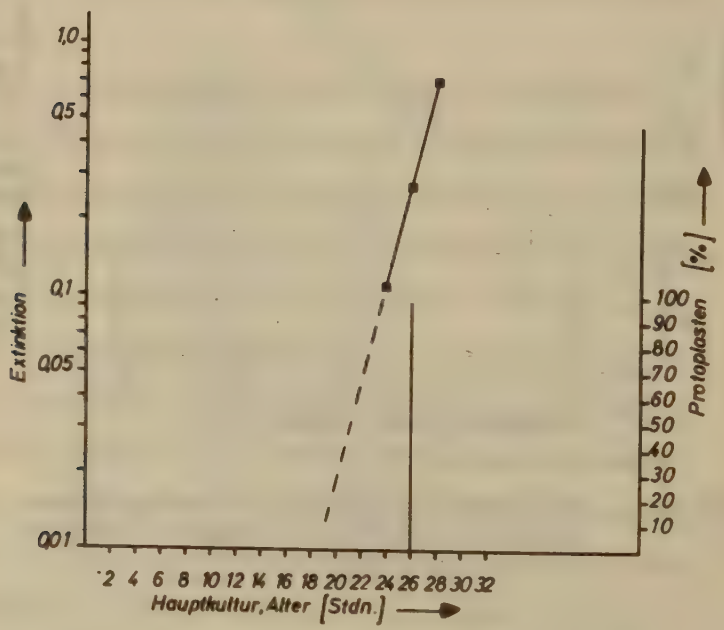

Abb. 14: Protoplastenbildung des diploiden Stammes nach 2,5 Stdn. Schneckenenzymeinwirkung unter besonderer Berücksichtigung der log. Wachstumsphase. Der Anfangstiter bestand aus Zellen einer 6 Monate alten Stammkultur.

3.1.5.1 Einfluß von Glucose und Aethanol auf die Protoplastenbildung

Die sich aus den bisherigen Untersuchungsbefunden ergebende Verringerung der Protoplastenbildung beim Übergang von der log. zur stationären Wachstumsphase (Extinktion = 0,7 - 0,8 / Abb. 12 u. 13) veranlaßte, den Einfluß des Glucose- und Alkoholgehaltes auf die Protoplastenbildung zu prüfen.

Zu diesem Zweck wurde das fl.HE-Medium, das bisher 2 % Glucose enthielt, für die Versuchsdurchführung im einzelnen wie folgt verändert:

1. Fl.HE-Medium mit einem Zusatz von nur 0,125 % Glucose.
   Es interessierte zu erfahren, ob die unter diesen Umständen wachsenden Zellen zur Protoplastenbildung fähig sind. Durch kleine Glucosekonzentrationen wird, wie aus Untersuchungen von POHLIT u.a. (1966) hervorgeht, die log. Wachstumsphase verkürzt und der Übergang zur stationären Phase verlängert.

2. Fl.HE-Medium ohne Glucose, jedoch mit einem Zusatz von 0,5 % Aethanol als Kohlenstoffquelle, um festzustellen, inwieweit das Verhalten der unter diesen Bedingungen im Verlauf der Vermehrung gebildeten Zellen mit dem der Zellen zu vergleichen ist, die während des Übergangs von der log. zur stationären Wachstumsphase gebildet wurden.

3. Fl.HE-Medium, dem - wie bisher - 2 % Glucose, jedoch 0,5 % Aethanol zugesetzt wurde, um zu prüfen, ob das Vorhandensein von Aethanol in Gegenwart von Glucose die Protoplastenbildung beeinträchtigt.

Die Versuche wurden, wie in der Methodik unter 2.3.1 A-Vorkultur und Hauptkultur beschrieben, durchgeführt. Extinktionen, bei denen jeweils Zellen zur Herstellung von Protoplasten entnommen wurden, sind aus der Abb. 15 ersichtlich.

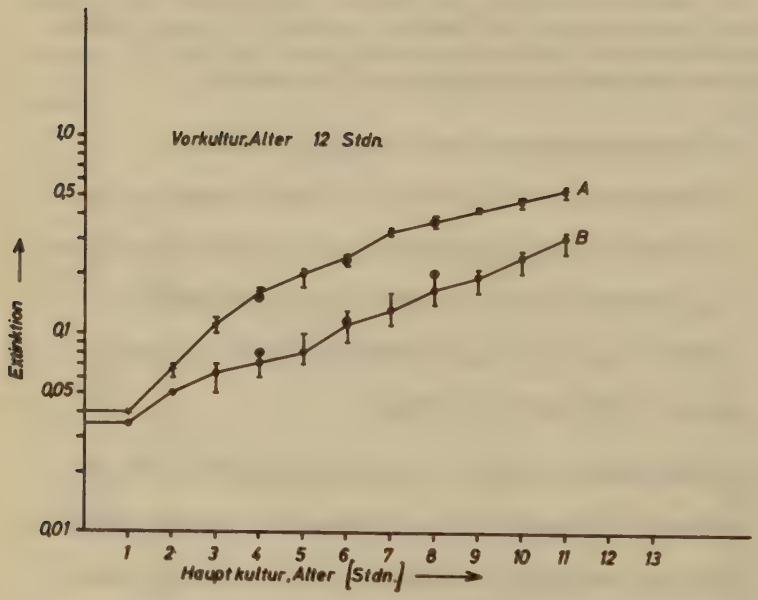

Abb. 15: Wachstumsverlauf des diploiden Stammes 211 in:
A) fl.HE-Medium, das 0,125 % Glucose enthält.
B) fl.HE-Medium ohne Glucose, jedoch mit einem Zusatz von 0,5 % Aethanol.

• = Extinktionen, bei denen jeweils Zellen zur Herstellung von Protoplasten entnommen wurden.

Die so durchgeführten Versuche ergaben, daß

1. Zellen, die in fl.HE-Medium, das nur 0,125 % Glucose enthielt, sowie

2. Zellen, die in fl.HE-Medium, das keine Glucose, jedoch einen Zusatz von 0,5 % Aethanol enthielt, aufwuchsen, nicht zur Bildung von Protoplasten fähig waren (Mikroskopische Beobachtungen ließen hier eine Schädigung der Zellen weder nach der Zugabe von Wasser noch nach dem Zentrifugieren erkennen.),

3. in fl.HE-Medium wachsende Zellen durch den Zusatz von 0,5 % Aethanol in Gegenwart von 2 % Glucose in ihrer Fähigkeit zur Protoplastenbildung nicht beeinträchtigt waren (s. Abb. 16).

Die Versuchsergebnisse werden in Kapitel 4.5 diskutiert.

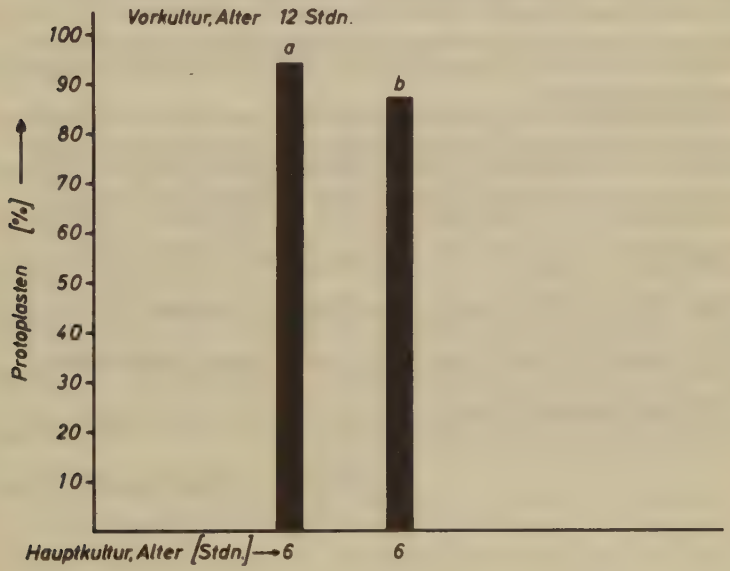

Abb. 16: Protoplastenbildung von Zellen des diploiden Stammes 211 in:
a) fl.HE-Medium,
b) fl.HE-Medium plus 0,5 % Aethanol.
Der Unterschied liegt innerhalb des Fehlerbereiches.

3.1.5.2 Protoplastenbildungsfähigkeit nach der Unterbrechung des Stoffwechsels

Die in Kapitel 3.1.5 geschilderten Versuchsergebnisse (Abb. 12) haben gezeigt, daß die Fähigkeit zur Bildung von Protoplasten zwischen der 6. und 8. Stunde der Hauptkultur deutlich abnimmt. Der nach 8 Stunden vorhandene Glucosemangel erwies sich als Ursache dieser Abnahme. Da zwischen der 6. und der 8. Stunde der Hauptkultur noch eine Zellvermehrung stattfindet (Extinktionsanstieg von 0,36 bis 0,74, d.h. Anstieg des Zelltiters von $0,75 \cdot 10^8$ auf $1,8 \cdot 10^8$), ist zunächst noch ungeklärt, ob der Glucosemangel zu einer Resistenz der Zellwand gegenüber dem Schneckenenzym nur bei Zellen führt, die in Abwesenheit von Glucose gebildet wurden, oder ob auch in Gegenwart von Glucose gebildete Zellen nach 2-stündigem Glucosemangel resistent werden. Um diese noch offenstehende Frage zu klären, wurden folgende Versuche unternommen:

Da der Abfall der Häufigkeit der Protoplastenbildung zwischen der 6. und der 8. Stunde der Hauptkultur bei Verwendung einer 60 Stunden alten Vorkultur am ausgeprägtesten ist (s. Abb. 12), wurde die Vorkultur in üblicher Weise 60 Stunden lang angezüchtet und dann eine Hauptkultur angelegt. Von den Zellen der Hauptkultur wurden nach jeweils 6 und 8 Stunden Proben entnommen und folgendermaßen behandelt:

Bebrütungszeit		Extinktion	Behandlung
1.	6 Stdn.	0,3	Herstellung von Protoplasten
2.	8 Stdn.	0,73	Herstellung von Protoplasten
3.	6 Stdn.	0,3	Waschen mit Phosphatpuffer und anschließend 2-stündige Aufbewahrung in Phosphatpuffer im Brutraum bei 30 °C, Herstellung von Protoplasten.
4.	6 Stdn.	0,3	Behandlung wie vorstehend genannt, jedoch im Kühlraum bei 4 °C.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurde festgestellt, daß, wie erwartet, nach einer Bebrütungszeit von 6 Stdn. mehr Protoplasten gewonnen wurden als nach 8 Stdn., wenn die Zellen im Nährmedium blieben. Dagegen waren die im Puffer suspendierten und bei 30 °C oder 4 °C aufbewahrten Zellen in etwa gleichem Ausmaß wie die Zellen der 6-stündigen Hauptkultur zur Protoplastenbildung befähigt (Abb. 17). Ein 2-stündiger Glucosemangel beeinträchtigte die Protoplastenbildung der in Glucosegegenwart gebildeten Zellen nicht. Die Unterbrechung des Stoffwechsels der bei 30 °C oder 4 °C aufbewahrten Zellen bewirkt demzufolge keine Veränderung der vom Schneckenenzym angreifbaren Zellwandeigenschaften. Die Verringerung der Protoplastenbildungsfähigkeit nach 8 Stunden Hauptkultur beruht also vor allem auf den Zellwandeigenschaften der während des Glucosemangels gebildeten Zellen.

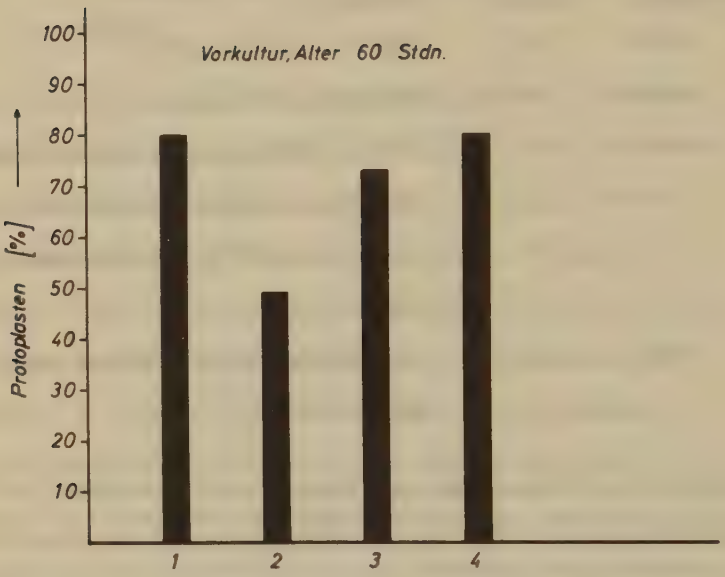

Abb. 17: Bildung von Protoplasten aus Zellen des diploiden Stammes 211, die in m/20 KH_2PO_4-Puffer inkubiert waren.

1 = Hauptkultur 6 Stdn.
2 = Hauptkultur 8 Stdn.
3 = Hauptkultur 6 Stdn. + 2 Stdn. in KH_2PO_4-Puffer im Brutraum bei 30° C.
4 = Hauptkultur 6 Stdn. + 2 Stdn. in KH_2PO_4-Puffer im Kühlraum bei 4° C.

3.1.5.3 Einfluß des pH-Wertes

Ob Veränderungen des pH-Wertes im Kulturmedium die Protoplastenbildung beeinflußt, war Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Wie Abb. 10 zeigt, nimmt der pH-Wert einer Kultur während der log. Wachstumsphase ab, steigt in den folgenden 13 Stdn. und weist anschließend eine fallende Tendenz auf. Nach etwa 50 Stdn. bleibt der pH-Wert bis zum Ende des

Versuchs konstant bei 5,1 - 5,2. Ein Zusammenhang zwischen dem Verlauf des pH-Wertes der verwendeten Kulturen und der Bildung von Protoplasten konnte nicht festgestellt werden. Die Häufigkeit der Protoplastenbildung wird demzufolge durch den Verlauf des pH-Wertes nicht beeinträchtigt.

3.2 Haltbarkeit der Protoplasten

Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, wird durch die Gewinnung von Protoplasten die Erforschung physiologischer, biochemischer und genetischer Vorgänge begünstigt. Für in diesem Zusammenhang durchzuführende Untersuchungen war es zweckmäßig festzustellen, bei welchen Temperaturen und für welchen Zeitraum Protoplasten aufbewahrt werden können.

Es wurden Protoplasten nach der bereits geschilderten Methode hergestellt. Vorkultur: 12 Stdn., Hauptkultur: 6 Stdn. Nachdem die Protoplasten bei 10 °C und 2000 U/Min. 5 Min. abzentrifugiert und einmal mit dem Stabilisator gewaschen worden sind, wurden sie in 1,4 m $MgSO_4$-Lösung abgeschwemmt und bei 4° C bzw. 25° C aufbewahrt.

Die Protoplasten konnten bei einer Temperatur von 4° C bis zu 7 Tagen erhalten werden, lediglich am letzten Tage war zum Teil eine Veränderung der vorher runden Form zu beobachten. Sämtliche Protoplasten der bis zum Ende des Versuchs jeweils entnommenen Proben platzten nach der Zugabe von Wasser. Bei 25° C war nach 24 Stdn. ein kleiner Teil, nach 48 Stdn. ca. ein Drittel der Protoplasten geplatzt.

Will man also hergestellte Protoplasten für einige Tage aufbewahren, so kann das bei einer Aufbewahrungstemperatur von 4° C bis zu 7 Tagen geschehen. Der Erhaltungszustand von Protoplasten nach längeren Aufbewahrungszeiten wurde nicht überprüft.

3.3 Regeneration von Protoplasten

Nach meinen Ausführungen über die Herstellung von Hefeprotoplasten möchte ich auf meine Versuche über deren Regeneration eingehen.

In den nachfolgend geschilderten Untersuchungen wurde insbesondere geprüft:

1. ob die aus Zellen haploider, diploider und tetraploider Stämme hergestellten Protoplasten regenerationsfähig sind,
2. welchen Einfluß unterschiedliche Gelatinekonzentrationen auf das Wachstum von Protoplasten haben, die von jeweils nach 4 Stdn. (Ext.: 0,12 - 0,15), nach 6 Stdn. (Ext.: 0,3 - 0,45) der log. Wachstumsphase und nach 8 Stdn. (Ext.: 0,7 - 0,8, Übergang von der log. zur stationären Wachstumsphase) geernteten Zellen der Hauptkultur stammen,
3. welchen Einfluß Lösungsmittel auf die Festigkeit von Gelatine haben,
4. wie sich Protoplasten, die unterschiedlichen Vorkulturen entstammen, verhalten.

3.3.1 Unterschiedliche Entwicklung der Protoplasten

Unmittelbar nach der Herstellung wurden die Hefeprotoplasten vom Schneckenenzym abzentrifugiert, mit dem Stabilisator gewaschen und übertragen in

a) HE-Medium ohne Agar mit 20 %iger Gelatine in 0,6 m $(NH_4)_2SO_4$-Lösung,

b) HE-Medium ohne Agar mit 20 %iger Gelatine in 1,2 m $MgSO_4$-Lösung.

Anschließend wurden die Protoplasten bei 25 °C im Brutschrank inkubiert. In Abständen von jeweils etwa einer Stunde wurden Proben entnommen und die Entwicklung mikroskopisch beobachtet.

Parallel hierzu wurden, um den Entwicklungsverlauf einzelner Protoplasten mikroskopisch beobachten zu können, einzelne Protoplasten unmittelbar nach der Übertragung in das vorgenannte Nährmedium auf den Objektträger aufgetragen, mit einem Glasplättchen abgedeckt und mit Paraffin abgedichtet.

Bereits nach 1 - 3 Stunden änderten die Protoplasten ihre bisher runde Form unter Zunahme des Volumens, wobei man feststellen konnte, daß die Entwicklung der einzelnen Protoplasten sehr unterschiedlich verlief (Abb. 18 - 22). Es wurden bei allen drei untersuchten Stämmen überwiegend vier Entwicklungsreihen beobachtet (s. Abb. 22). Zwei davon (1. - 2.) führen zur Bildung von vegetativen Hefezellen; die beiden anderen (3. - 4.) werden wahrscheinlich durch bestimmte Umweltbedingungen (möglicherweise durch Trockenheit) hervorgerufen; eine Bildung vegetativer Zellen ist in letzteren Fällen zwar nicht beobachtet worden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

1. Ein Teil der Protoplasten vergrößert sich und bildet gleichzeitig Knospen, die auch größer als die normaler Zellen sind. Erst in der 3.-4. Generation

bilden sie Zellen, die den normalen ähneln (Abb. 18 a und 18 b) und zur Bildung von Kolonien fähig sind.
Andere Protoplasten wiederum vergrößern sich, erhalten eine runde Form, um unmittelbar danach normale Zellen zu bilden (Abb. 18 c), die auch durch die Zugabe von Wasser nicht platzen.
Hierbei war Abb. 18 a die meist beobachtete Form innerhalb dieser Reihe.

2. Protoplasten strecken und dehnen sich unterschiedlich (Abb. 19 a, b und c).Erst später bilden sich Zellen, die fähig sind, normale Zellen zu entwickeln und Kolonien zu bilden.

3. Protoplasten vergrößern und strecken sich. Anschließend teilen sie sich in runde Gebilde (Abb. 20), die möglicherweise auch zur Bildung vegetativer Hefezellen fähig sind, obwohl eine solche Beobachtung nicht gemacht wurde.

4. Protoplasten, deren Streckungsfähigkeit gering ist. Sie vergrößern sich etwas und lassen runde Gebilde entstehen (Abb. 21). Ob diese ebenfalls intakte Zellen bilden können, konnte nicht festgestellt werden.

Die ersten drei Entwicklungsreihen wurden mit Hilfe der Bolex-Kamera (Zeitraffer-Filmaufnahmen) im Phasenkontrastmikroskop aufgenommen; hierzu wurde der tetraploide Stamm verwendet. Die Protoplasten der verschiedenen Stämme ließen während des Wachstums, insbesondere gilt das für sich streckende Protoplasten, mikroskopisch keinen Unterschied erkennen. Erst nach der Bildung von intakten Zellen wurden die bekannten Unterschiede in der Zellform und -größe wieder deutlich (vgl. hierzu auch Abb. 19, 23 und 24).
Für die Streckung und mannigfaltige Formveränderung der einzelnen Protoplasten sind neben dem Fehlen der Zellwand u.a. folgende Faktoren verantwortlich:

Gelatinekonzentration und Bebrütungstemperatur, Lösungsmittel für die Gelatine sowie die Vor- und Hauptkultur im Zusammenhang mit der log. Wachstumsphase.

Im folgenden wird über die Bedeutung dieser Faktoren berichtet.

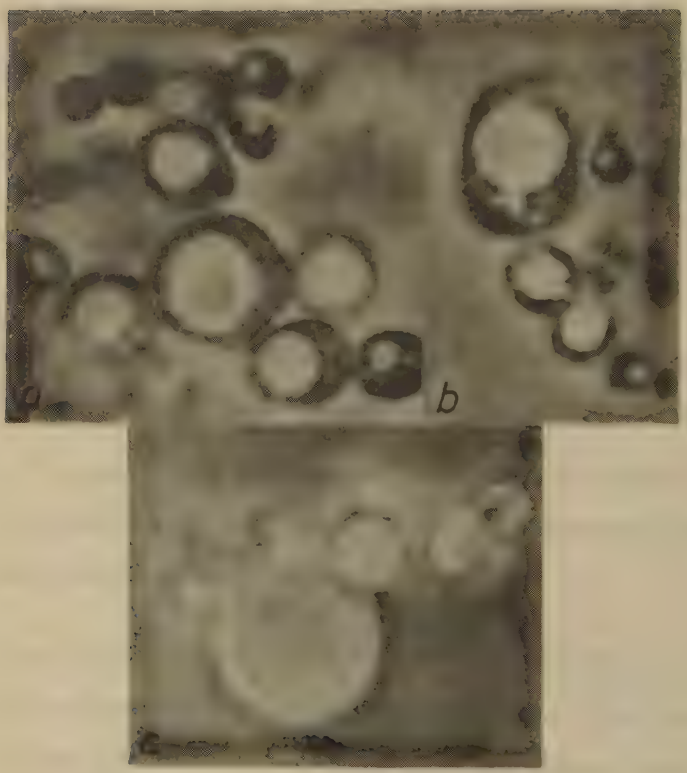

Abb. 18: Vergrößerte Protoplasten des diploiden Stammes, die zur Bildung von intakten Zellen fähig waren, in 20 %iger Gelatine.

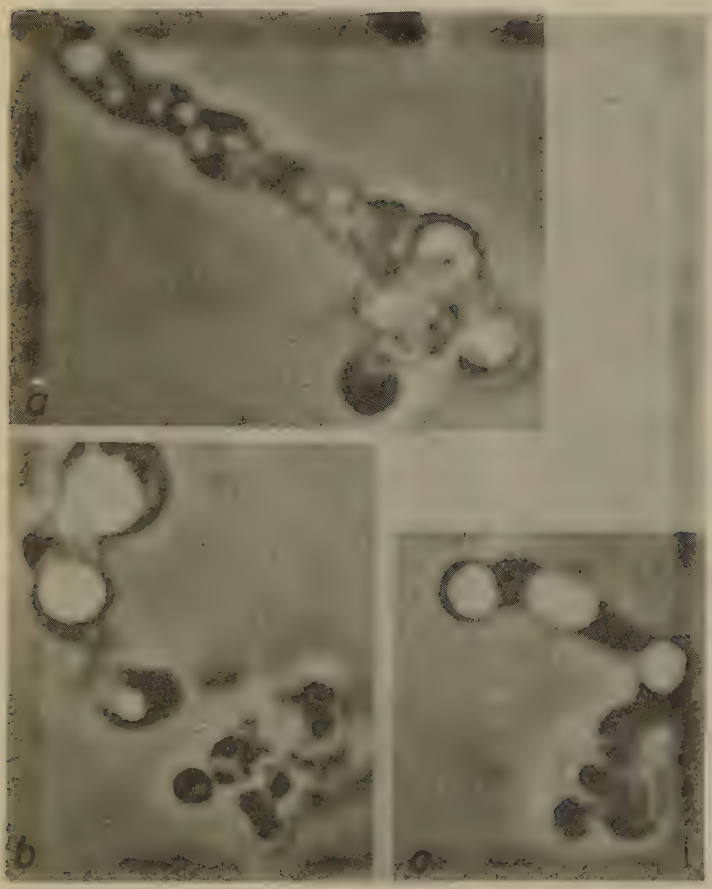

Abb. 19: Gestreckte und vergrößerte Protoplasten des diploiden Stammes, die nach Abschluß der Streckung zur Bildung von intakten Zellen fähig waren, in 20 %iger Gelatine.

Abb. 20: Entwicklungsverlauf von 2 Protoplasten des diploiden Stammes (a und b) in HE-Medium ohne Agar mit 20 %iger Gelatine.

a
b
a
b
b
a
b

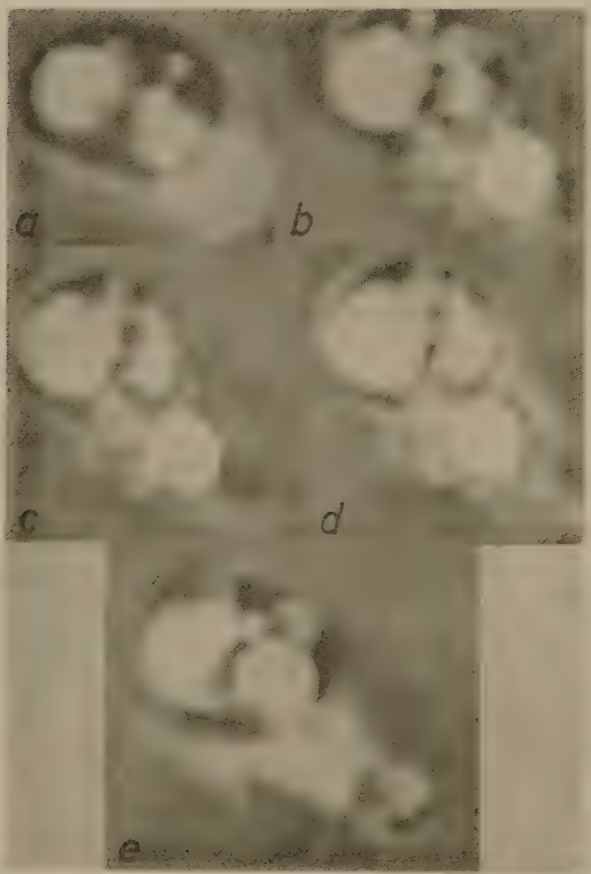

Abb. 21: Entwicklungsverlauf eines Protoplasten des diploiden Stammes in HE-Medium ohne Agar mit 20 %iger Gelatine.

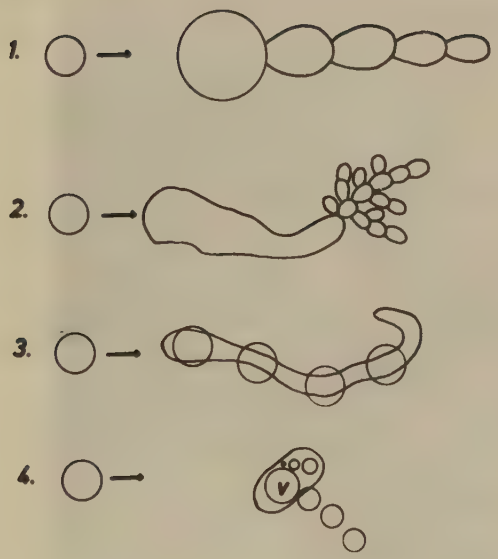

Abb. 22: Schematische Darstellung der vier unterschiedlichen Entwicklungsreihen von Protoplasten.

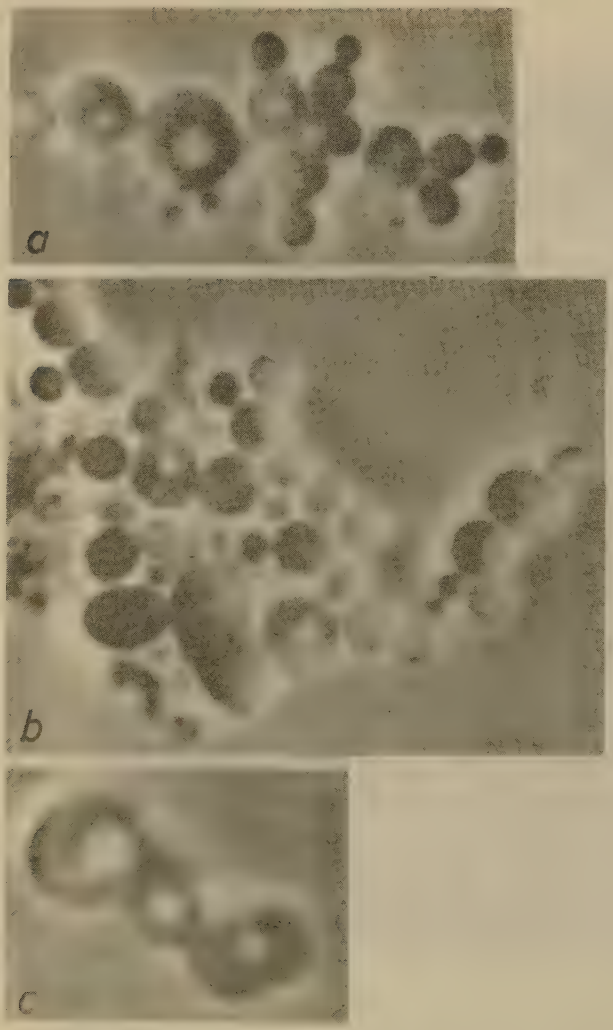

Abb. 23: a-b: Vergrößerte Protoplasten des haploiden Stammes, die zur Bildung von intakten Zellen fähig waren, in 10 %iger Gelatine.

c: Vergrößerter und gestreckter Protoplast des haploiden Stammes in 10 %iger Gelatine.

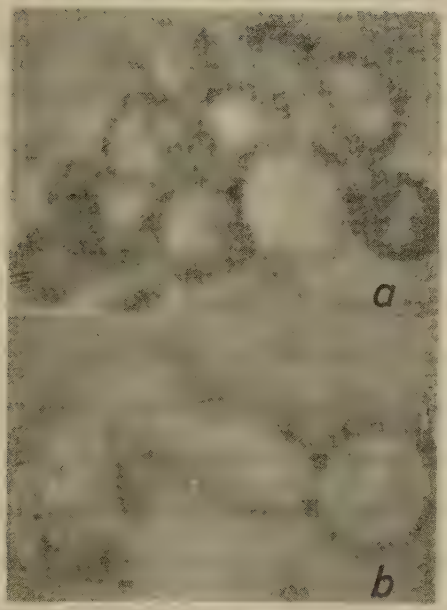

Abb. 24: a. Vergrößerter Protoplast des tetraploiden Stammes, der zur Bildung von intakten Zellen fähig war, in 20 %iger Gelatine.

b. Vergrößerter und gestreckter Protoplast des tetraploiden Stammes in 10 %iger Gelatine.

3.3.1.1 Einfluß von Gelatinekonzentrationen und Bebrütungstemperaturen

Wie aus den Veröffentlichungen von u.a. EDDY und WILLIAMSON (1957, 1959), HOLTER und OTTOLENGHI (1960), ROST und VENNER (1965), MÜLLER (1965), NURMINEN, OURA und SUOMALAINEN (1965) und OTTOLENGHI (1966) hervorgeht, werden Protoplasten mit Hilfe eines Stabilisators stabil erhalten. Eine stabilisierende Wirkung hat auch Gelatine, die dem Nährmedium zugesetzt wird; sie übernimmt, obgleich in geringerem Maße, die Schutzfunktion der Zellwand und verhindert das Platzen von Protoplasten bei der Vergrößerung und Streckung. Ähnlich folgerten ROST und VENNER (1965). In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß der physikalische Zustand des verwendeten Nährmediums nicht nur von der Gelatinekonzentration, sondern auch von der Bebrütungstemperatur abhängig ist.

Beobachtungen ergaben, daß zwischen der Häufigkeit der einzelnen Entwicklungsreihen (Kapitel 3.3.1) und der Gelatinekonzentration ein unmittelbarer Zusammenhang besteht. Bei der erwähnten Konzentration von 20 % Gelatine und 25 °C Bebrütungstemperatur kommen alle vier Entwicklungsreihen vor. Hierbei sind die ersten beiden Entwicklungsreihen häufiger als die anderen Reihen zu beobachten. Die 2. Reihe ist wiederum häufiger als die 1. Reihe festzustellen. Auch bei Verwendung einer 10 %igen Gelatinekonzentration und 25 °C Bebrütungstemperatur ist diese Häufigkeit der Entwicklungsreihen zu beobachten. Beträgt die Gelatinekonzentration jedoch 30 oder 40 % und die Bebrütungstemperatur 25 °C, ist die Häufigkeit der mit 1. und 2. bezeichneten Entwicklungsreihen fast gleich. Die 3. Reihe ist zwar häufiger als die 4. zu beobachten, doch ist das Auftreten der letzten beiden Reihen im Verhältnis zu 1. und 2. wesentlich geringer.

Im allgemeinen ergaben die zahlreichen Beobachtungen, daß das Streckungs- und Vergrößerungsvermögen der Protoplasten in höheren Gelatinekonzentrationen geringer ist. Wie ich bereits erwähnte, verlief die Entwicklung der einzelnen Protoplasten selbst innerhalb einer Versuchsreihe sehr mannigfaltig. Die Ursache hierfür ist meiner Meinung nach in dem unterschiedlichen Alter der verwendeten Zellen zu suchen. Eine weitgehend einheitliche Entwicklung könnte wohl nur durch synchronisierte Kulturen erreicht werden. Daß die Feuchtigkeit und das Milieu eine wichtige Rolle spielen, ist aus der Entwicklung von Protoplasten auf dem Objektträger zu folgern, dessen Randflächen und Deckglas mit Paraffin abgedichtet waren. Diese Protoplasten streckten und vergrößerten sich weniger als die Protoplasten in 50 ml fassenden Erlen-Meyer-Kolben.
Wie aus Abb. 25 zu ersehen ist, verändert sich die Häufigkeit der Bildung von Kolonien bei allen untersuchten Protoplasten mit Veränderung der Gelatinekonzentration bei jeweils 25 °C. Wird die Gelatinekonzentration von 10 auf 20 % erhöht, steigert sich auch die Häufigkeit der Kolonienbildung; ein maximaler Prozentsatz wird bei Verwendung einer 30 %igen Gelatinekonzentration erreicht.
Eine Erhöhung der Konzentration auf 40 % hat jedoch stets eine Verringerung der Koloniebildungsfähigkeit zur Folge. Abb. 25 ermöglicht auch einen Vergleich der Häufigkeit der Kolonienbildung von Protoplasten aus Zellen, die jeweils nach 4 Stdn. (Ext.: 0,12), nach 6 Stdn. (Ext.: 0,32) der log. Wachstumsphase und während des Übergangs zur stationären Phase - nach 8 Stdn. (Ext.: 0,73) - geerntet worden waren. Hierbei zeigten Protoplasten aus Zellen, die

nach 6 Stdn. der Hauptkultur (Ext.: 0,32) geerntet worden waren, die größte Häufigkeit der Bildung von Kolonien, deren Maximum mit 60 % erreicht wurde. Zu bemerken ist, daß nicht alle sich streckenden und vergrößernden Protoplasten auch Kolonien bildeten.

Nicht zur Regeneration fähig waren Protoplasten in fl.HE-Medium, in HE-Medium ohne Agar, gelöst in 0,6 m $(NH_4)_2SO_4$ bzw. in 1,2 m $MgSO_4$ sowie auf festem HE-Medium gezüchtete Protoplasten bei 25 °C oder 30 °C. Sie lysierten nach Beginn oder während der Volumenzunahme. Die Zugabe von 10 %iger Gelatine in das fl.HE-Medium bewirkte eine Stabilisation der Protoplasten bei 25 °C aber nicht bei 30 °C. Bei 30 °C lysierten die Protoplasten während der Vergrößerung und Streckung. Erst nach der Verwendung von Ammonium- und Magnesiumsulfat als Lösungsmittel für die 10 %ige Gelatine wurden die Protoplasten auch bei 30 °C stabilisiert. Sie vergrößerten und streckten sich, ohne jedoch intakte Zellen zu bilden.

Wie ich schon erwähnte, ist der physikalische Zustand des Nährmediums nach dem Zusatz von Gelatine von der Temperatur abhängig. So wurde beobachtet, daß bei niedrigen Temperaturen die Streckung und Vergrößerung geringer war, jedoch die Regeneration häufiger verlief. Eine Erhöhung der Temperatur während der Versuchsdauer hatte unmittelbar eine Steigerung der Streckung und Vergrößerung zur Folge. In einem Nährmedium mit 10 %iger Gelatine verlief die Entwicklung der Protoplasten bei 25 °C wie bei einem Nährmedium mit 20 %igem Gelatinegehalt aber 30 °C Bebrütungstemperatur.

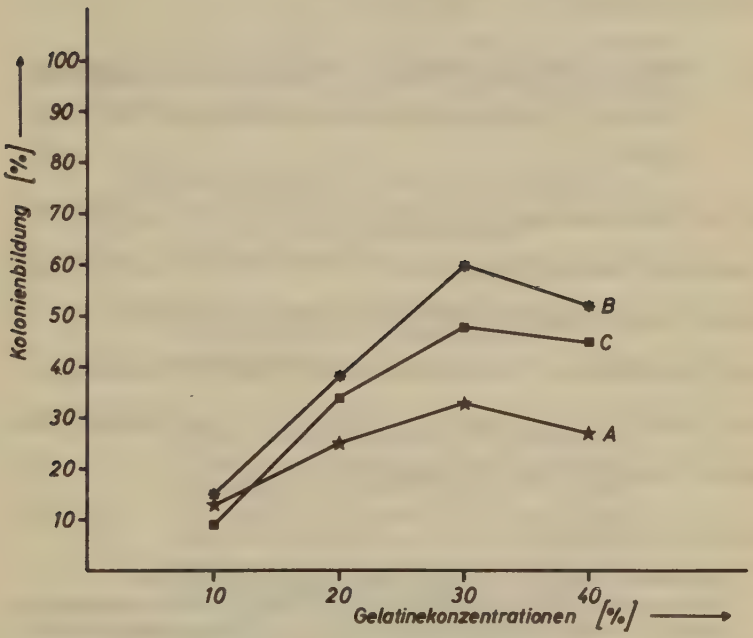

Abb. 25: Koloniebildungsfähigkeit von Protoplasten des diploiden Stammes in Abhängigkeit von der Gelatinekonzentration bei 25 °C.
Die Protoplasten wurden jeweils aus Zellen hergestellt, die nach 4 Stdn., Ext.: 0,12 (A), nach 6 Stdn., Ext.: 0,32 (B), der log. Wachstumsphase und während des Übergangs zur stationären Phase - nach 8 Stdn., Ext.: 0,73 (C) - geerntet worden waren.

Zusammenfassend sei wiederholt, daß Protoplasten bei Verwendung von 10 - 40 %iger Gelatine und HE-Medium ohne Agar, gelöst in 0,6 m $(NH_4)_2 SO_4$, bei 25 °C mit unterschiedlicher Häufigkeit regenerieren (Abb. 25). Bei 30° C sind Protoplasten in einem Nährmedium in flüssigem Zustand (auch nach dem Zusatz von 10 %iger Gelatine noch flüssig) sowie auf festem HE-Medium gezüchtete Protoplasten nicht zur Regeneration fähig.

3.3.1.1.1 Ermittlung des Prozentsatzes der Protoplasten, die zur Bildung von Kolonien fähig sind, anhand eines vereinfachten praktischen Beispiels

Nach den Versuchsergebnissen waren nicht alle mit Schneckenenzym behandelten Zellen zur Protoplastenbildung fähig. Einige vom Schneckenenzym nicht angegriffene Zellen bildeten nach der Zugabe von Wasser noch Kolonien.
Um die Häufigkeit der zur Kolonienbildung fähigen Protoplasten bestimmen zu können, wurde die Zahl der Protoplasten und die Zahl der von diesen gebildeten Kolonien [3], wie nachstehend angegeben, ermittelt:

---

3) Der Versuch wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
Die Protoplasten wurden nach der auf Seite 7 beschriebenen Methode hergestellt. Das Alter der Vorkultur betrug 12, das Alter der Hauptkultur 6 Stunden. Durch Zentrifugation wurden die Protoplasten vom Schneckenenzym isoliert, einmal mit 1,2 m $MgSO_4$ gewaschen und abzentrifugiert. Im Anschluß daran wurde 1,2 m $MgSO_4$ - Lösung als Stabilisator zugegeben. Dieser Protoplastensuspension wurden die für die Versuchsdurchführung benötigten Protoplasten entnommen.
Nachdem die Zahl der Protoplasten und auch die Zahl der Zellen der Kontrolle durch mikroskopisches Auszählen in einer Zählkammer festgestellt worden war, wurden die Protoplasten und Zellen auf das in Petrischalen ausgegossene Nährmedium (HE-Medium ohne Agar mit 30 %iger Gelatine in 0,6 m $(NH_4)_2SO_4$-Lösung) ohne Spatel verteilt und bei 25°C im Brutschrank 4 Tage inkubiert.
Nach der Inkubation wurde die Zahl der von Protoplasten vor und nach der Zugabe von Wasser und die Zahl der von den Zellen der Kontrolle gebildeten Kolonien, wie in diesem Kapitel beschrieben, ermittelt.

1. Auszählung in einer Zählkammer

1a Zahl der Zellen der Kontrolle betrug = 300

1b Zahl der Protoplasten = 271

1c Zahl der nicht geplatzten Zellen nach Zugabe von Wasser zur Protoplasten-Suspension = 29

Hierdurch wurde die Zahl der nicht vom Schneckenenzym angegriffenen Zellen ermittelt und zugleich die Zahl der nach der Zugabe von Wasser geplatzten Protoplasten, die unter 1 b durch Zählung der Protoplasten festgestellt wurde, bestätigt.

2. Kolonienbildung nach dem Ausplatten, nicht Spateln

2a Zahl der von den Kontrollzellen gebildeten Kolonien = 300

2b Zahl der von der Protoplasten-Suspension ohne Zugabe von Wasser gebildeten Kolonien = 192

Hierbei handelt es sich um von Protoplasten und Zellen gebildete Kolonien. Wie bereits erwähnt, ist das Platzen nach der Zugabe von Wasser für Protoplasten charakteristisch. Folglich wird das nachstehende Ergebnis von 2c von dem unter 2b erzielten subtrahiert und somit die Zahl der koloniebildungsfähigen Protoplasten ermittelt.

2c Zahl der von der Protoplasten-Suspension nach der Zugabe von Wasser gebildeten Kolonien = 29

2b = 192 von Zellen und Protoplasten gebildete Kolonien

2c = 29 von Zellen gebildete Kolonien

163 von Protoplasten gebildete Kolonien

Protoplasten 1b = 271 = 100 %

" Kolonien = 163 = 60 %

Somit waren 60 % der Protoplasten zur Koloniebildung fähig.

3.3.1.1.2 Lösungsmittel für die Gelatine

Die Festigkeit der Gelatine, welche die Vergrößerung und Streckung beeinflußt, ist vom Lösungsmittel abhängig.

Wie ich schon ausführte, wurde anfänglich $(NH_4)_2SO_4$ und später ausschließlich $MgSO_4$ zur Stabilisation von Protoplasten verwendet. Auch bei den Untersuchungen über die Regenerationsfähigkeit von Protoplasten wurden diese beiden Stabilisatoren dem Lösungsmittel für das Nährmedium und die Gelatine zugesetzt. Hierbei wurde beobachtet, daß nach dem Zusatz von 1,2 m $MgSO_4$ zum Lösungsmittel die Gelatine mehr gefestigt wurde als durch den Zusatz von 0,6 m $(NH_4)_2SO_4$. Es zeigte sich, daß das Nährmedium und die 10 %ige Gelatine, die mit Hilfe von H_2O oder einer $(NH_4)_2SO_4$ enthaltenden Lösung gelöst wurden, bei 30 °C flüssig blieben, während sie sich bei Verwendung von $MgSO_4$ festigten. Diese Feststellung wurde auch gemacht, wenn die molare Lösung von $(NH_4)_2SO_4$ und $MgSO_4$ gleich war, z.B. jeweils 0,6, 0,8 oder 1,2 betrug. Das geringere Vergrößerungs- und Streckungsvermögen von Protoplasten in Nährmedium und Gelatine, bei denen $MgSO_4$ als Lösungsmittel zugesetzt wurde, ist vermutlich auf die festigende Wirkung des Magnesiumsulfats zurückzuführen.

$MgSO_4$ (0,6, 0,8 oder 1,2 m) wurde für die Regenerationsversuche nicht weiterverwendet, da sich durch die Erhöhung der Gelatinekonzentration auf 30 oder 40 %, die Festigkeit des Nährsubstrates so erhöhte, daß eine gleichmäßige Mischung nicht möglich war. Auch durch Erhitzen konnte eine gleichmäßige Verteilung nicht erreicht werden, da die Gelatine schäumte und fest am Erlen-Meyer-Kolben haftete. Folglich wurde für die weiteren Untersuchungen nur $(NH_4)_2SO_4$ (0,6 m) verwendet.

3.3.1.2 Einfluß der Vor- und Hauptkultur im Zusammenhang mit der log. Wachstumsphase

Wie ich bereits erwähnte, unterscheiden sich die jeweils am Anfang (Ext. = 0,12), in der Mitte (Ext. = 0,3) der log. Wachstumsphase und beim Übergang von der log. zur stationären Phase (Ext. = 0,7) entnommenen Zellen bei der Protoplastenbildung.

Zellen von jüngeren Vorkulturen (Alter z.B. 12 Stdn., davon 2 Stdn. Übergang von der log. zur stationären Wachstumsphase) und Hauptkulturen (Ernte nach 4 Stdn., Ext. = 0,12) bildeten Protoplasten mit größerem Streckungs- und Vergrößerungsvermögen. Diese Protoplasten besaßen jedoch eine verhältnismäßig geringe Fähigkeit zur Bildung von intakten Zellen. Eine größere Häufigkeit der Bildung von intakten Zellen wurde bei Protoplasten aus Zellen mit der gleichen Vorkultur und einer Hauptkultur von 6 (Ext. = 0,32) bzw. 8 Stdn. (Ext. = 0,73, Abb. 25) beobachtet. Wurde anstelle einer jüngeren (12 Stdn.) eine 60 Stdn. alte Vorkultur (davon 20 Stdn. Übergang von log. zu stationärer Wachstumsphase und 30 Stdn. stationäre Phase) sowie eine 6 bzw. 8 Stdn. alte Hauptkultur verwendet, war nach einem geringeren Streckungs- und Vergrößerungsvermögen die Häufigkeit der Bildung von intakten Zellen ebenfalls größer.

Protoplasten aus Zellen, die nach 6 Stdn. Hauptkultur (Ext. ca. 0,3, Mitte der log. Wachstumsphase) geerntet worden waren, zeigten vergleichsweise die größte Häufigkeit zur Bildung von intakten Zellen (vgl. Abb. 25).

3.3.2 Empfindlichkeit der wachsenden Protoplasten

Untersuchungen, ob die während der Regeneration vergrößerten und gestreckten Protoplasten osmotisch stabil sind, zeigten, daß sie keinen osmotischen Schock (Abb. 26 a) oder mechanischen Druck (Abb. 26 b) vertragen können; auch die erste Generation war noch empfindlich gegenüber osmotischer Veränderung.

Erst die Zellen, die eine normale Größe und Form angenommen hatten (elliptisch bei diploiden und tetraploiden, rund bei haploiden Stämmen), erwiesen sich gegenüber den vorgenannten Einflüssen als stabil.

Eine Beeinträchtigung des Wachstums von Protoplasten [4] konnte auch nach 36-stündiger Aufbewahrung im Kühlraum bei 4 °C nicht beobachtet werden.

---

4) Die Protoplasten wurden unmittelbar nach der Herstellung im Kühlraum aufbewahrt.

Abb. 26: a: Wachsende Protoplasten des diploiden Stammes, die sich nach der Zugabe von Wasser noch mehr vergrößerten, um anschließend zu platzen.

b: Wachsender Protoplast des haploiden Stammes, der durch Druck zum Platzen gebracht wurde.

a-b in 10 %iger Gelatine.

4. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Obwohl bereits seit den Untersuchungen von GIAJA 1914, 1919 und 1922 bekannt ist, daß der Darmsaft der Weinbergschnecke Helix pomatia die Zellwand der Hefen auflösen kann, gewann die Herstellung von Protoplasten mit Hilfe des Schneckenenzyms erst in den letzten zwölf Jahren wegen der dadurch ermöglichten günstigeren Bedingungen für die Erforschung physiologischer, biochemischer und genetischer Vorgänge erheblich an Bedeutung.

Wenn auch die Herstellung von Hefeprotoplasten schon von einer Vielzahl von Autoren beschrieben worden ist, so fehlte bisher doch eine systematische Untersuchung der Faktoren, die einen entscheidenden Einfluß auf die Protoplastenbildung haben.
Die bisher häufig bei der Herstellung von Protoplasten entstandenen Schwierigkeiten sind auf die Unkenntnis der Einflüsse dieser Faktoren zurückzuführen.

Meine Untersuchungen über die die Protoplastenbildung beeinflussenden Faktoren wurden unter Berücksichtigung der von EDDY und WILLIAMSON (1957) sowie von ROST und VENNER (1965) angewandten Methode durchgeführt, die jedoch u.a. im Hinblick auf den Stabilisator, die Enzymkonzentration sowie die Einwirkungsdauer von mir geändert wurde.

4.1 Die Stabilisatoren

Zur Erhaltung der osmotisch sensiblen Protoplasten ist eine isotonische Lösung erforderlich. Durch einen solchen "Stabilisator" wird ein Platzen während und

nach der Zellwandverdauung verhindert. Als hierfür geeignet erwies sich $(NH_4)_2SO_4$, das bereits von ROST und VENNER (1965) bei der Herstellung von Protoplasten als Stabilisator verwendet worden war. $(NH_4)_2SO_4$ konnte jedoch infolge seiner hemmenden Einwirkung auf die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase (Abb. 2) sowie auf Protoplasten (S. 17), die mit seiner Hilfe als Stabilisator hergestellt waren, nicht mehr verwendet werden. Diese starke Hemmung wurde nur bei diesem Stabilisator, und auch nur dann festgestellt, wenn die Zellen wie bei der Herstellung von Protoplasten behandelt wurden (vgl. hierzu die Ausführungen in Kapitel 2). Im Gegensatz hierzu war die Hemmung bei Zellen aus der stationären Phase nur geringfügig.

Nach HEINE (1967) scheint die Zahl der Schichten und damit die Dicke der Zellwände milieu- und altersbedingt zu sein [5]. Angaben über die Zahl der Schichten und die Dicke der Zellwände von jüngeren im Verhältnis zu älteren Zellen wurden nicht gemacht. Es wurde jedoch insbesondere darauf hingewiesen, daß das Entwicklungsstadium, das wiederum von den Anzuchtbedingungen stark abhängt, für viele morphologische Strukturmerkmale

---

5) Diese Angaben beziehen sich auf die von der Verfasserin untersuchten verschiedenen Hefearten - u.a. auch von Saccharomyces cerevisiae -. Hierzu sei bemerkt, daß die Zahl der Schichten nach meiner Auffassung nicht unbedingt die Dicke der Zellwand bestimmen muß, sondern möglicherweise von der Dicke der jeweiligen Schicht abhängig ist. So können z.B. jüngere und ältere Zellen dieselbe Anzahl von Schichten haben, die sich jedoch in ihrer Dicke unterscheiden.

verantwortlich zu sein scheint.

Aufgrund der von mir erzielten Untersuchungsergebnisse kann angenommen werden, daß zwischen dem Entwicklungsstadium (log. Wachstumsphase) und dem hemmenden Einfluß von $(NH_4)_2SO_4$ auf Zellen aus diesem Stadium ein Zusammenhang besteht. Zellen aus der log. Wachstumsphase sind offenbar infolge des durch dieses Stadium bedingten physiologischen Zustandes stärker der $(NH_4)_2SO_4$-Einwirkung ausgesetzt als Zellen aus der stationären Phase. Es ist jedoch auch möglich, daß diese hemmende Einwirkung nur indirekt durch $(NH_4)_2SO_4$ ausgelöst wird, denn UHL berichtet 1960 in "Die Hefen", daß aus Ammoniumsulfat, das den Hefen als Stickstoffnahrung gereicht wird, durch Assimilation des Ammonstickstoffes freie Schwefelsäure gebildet wird.

Ohne hemmende Einwirkung auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen erwies sich $MgSO_4$, das auch von SUOMALAINEN, NURMINEN u. OURA (1966), GASCON, GARCIA, OCHOA, NOVAES u. VILLANUEVA (1965), sowie für die Erhaltung der Vakuolen von GARCIA-ACHA, LOPEZ-BELMONTE u. VILLANUEVA (1967) als Stabilisator verwendet wurde.

4.2 Die Enzymkonzentration und deren Einwirkungsdauer

Wie ich schon im Kapitel 3 erwähnte, ist unter anderem die Enzymkonzentration bei der Herstellung von Protoplasten zu berücksichtigen. Der hierbei verwendete Darmsaft der Weinbergschnecke Helix pomatia [6] besteht aus verschiedenen Enzymen HOLDEN u. TRACEY 1950, ANDERSON u. MILLBANK 1966).

---

6) Das Schneckenenzym wurde von L'Industrie Biologique Francaise, 35-49 Quai du Moulin de Cage, Gennevilliers, Seine, Frankreich, bezogen.

Obwohl verschiedentlich berichtet wurde, daß die erforderliche Konzentration des jeweils verwendeten Schneckenenzyms und die Einwirkungsdauer in Abhängigkeit von dem jeweils verwendeten Stamm variiert (RODRIGUEZ-AGUIRRE u. VILLANUEVA 1962, ROST u. VENNER 1965 und MÜLLER 1965), erwies sich für die von mir untersuchten Stämme aller Ploidiegrade eine konstante Konzentration des von mir verwendeten Schneckenenzyms und Einwirkungsdauer als am besten geeignet. Wahrscheinlich ist dieser Umstand auf den weitestgehend isogenen und homozygoten Zustand der Stämme (LASKOWSKI 1962) zurückzuführen.

Allerdings benötigten nicht alle Zellen die verwendete Konzentration und Einwirkungsdauer, da sie sich nicht - wie bei synchronisierten Kulturen - in einem einheitlichen Stoffwechselzustand befinden. Um jedoch einen möglichst hohen Prozentsatz an Protoplasten zu erzielen, wurden die Konzentration und Einwirkungsdauer nicht verändert. Eine höhere als die regelmäßig verwandte Konzentration führte nicht nur zu der erstrebten Zellwandablösung, sondern wirkte sich auch auf das Plasmalemma aus und hatte schließlich innerhalb kurzer Zeit eine Lyse des Zellinhaltes zur Folge (Abb. 3a - b). Dieser Effekt wird vermutlich durch die Reaktionsgeschwindigkeit, die als proportional zu der Konzentration der Ferment-Substratverbindung angenommen werden kann, ausgelöst. Es liegt jedoch im Bereich der Möglichkeiten, daß die Lyse nicht allein durch die erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit verursacht wurde, sondern auch durch Spuren weiterer Enzyme [7], die durch die erhöhte Konzentration unverhältnismäßig angereichert vorhanden waren.

---

7) Der für die Versuchsdurchführung verwandte Verdauungssaft der Weinbergschnecke Helix pomatia enthält nach den Angaben des Herstellers ß-Glucuronidase und Sulfatase. Den Angaben ist nicht zu entnehmen, ob nur diese oder noch andere Enzyme vorhanden sind.

4.3 Der Einfluß der Temperatur

Wie schon in Kapitel 3.1.4 - Einwirkung des Enzyms auf die Protoplastenbildung in Abhängigkeit von der Temperatur - ausgeführt wurde, ist bei Temperaturen von 20 bzw. 25° C die größte Häufigkeit der Protoplastenbildung zu verzeichnen. Demgegenüber platzen die meisten Protoplasten bei Temperaturen von 30 bzw. 35° C während der Inkubationszeit. Es ist anzunehmen, daß das Platzen der Protoplasten nicht direkt auf die erhöhte Temperatur zurückzuführen ist, sondern dadurch eintreten kann, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Einwirkung mit der Temperaturerhöhung, wie bei jeder chemischen Reaktion, zunimmt.

In diesem Zusammenhang scheint es wichtig zu erwähnen, daß die geschilderte Schädigung (Lyse) der Protoplasten bei Temperaturen von 30 bzw. 35° C nur festzustellen ist, wenn die Enzymkonzentration - die regelmäßig verwandt wurde - 2,66 % oder mehr beträgt. Eine niedrigere Enzymkonzentration von z.B. 1,3 % verursacht zwar eine geringere Schädigung, doch ist die hierdurch erzielte Häufigkeit der Protoplastenbildung auch verhältnismäßig gering.

Diesen Untersuchungsergebnissen ist jedenfalls eindeutig zu entnehmen, daß die Temperatur bei der Herstellung von Protoplasten als wesentlicher Faktor zu berücksichtigen ist. So ist zur Erreichung der Stabilisation der Protoplasten nicht nur die Auswahl eines geeigneten Stabilisators, sondern auch die Auswahl einer geeigneten Temperatur erforderlich.

4.4 Darstellung und Diskussion des Einflusses des Alters der Vor- und Hauptkultur im Zusammenhang mit der logarithmischen Wachstumsphase

Der Einfluß des Alters der Vorkultur auf das der Hauptkultur und vor allem die Bedeutung der logarithmischen Wachstumsphase sind bei der Herstellung von Protoplasten bisher nicht ausreichend beachtet worden.
Es wurde zwar angegeben, daß die verwendeten Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase stammen oder jüngere Zellen geeigneter sind als ältere (EDDY u. WILLIAMSON 1957, SVIHLA, SCHLEK u. DAINKO 1961, RODRIGUEZ-AGUIRRE u. VILLANUEVA 1962, ROST u. VENNER 1965, MÜLLER 1965, NURMINEN, OURA u. SUOMALAINEN 1965, ZVJAGILSKAYA u. AFANASJEWA 1965, SUGAWARA 1966). Quantitative Versuche über die Bedeutung dieser Faktoren wurden jedoch bisher nicht durchgeführt. Aus meinen Untersuchungsbefunden wird deutlich, daß eine genaue Kenntnis dieser Faktoren nicht nur für die Bildung von Protoplasten, sondern auch für die Regeneration wichtig ist (Abb. 25).

Zur Interpretation der von mir ermittelten Ergebnisse über den Einfluß des Alters der Vorkultur auf das der Hauptkultur in Verbindung mit der logarithmischen Wachstumsphase und der Schlußfolgerungen, die sich insbesondere über den Abbau der die Resistenz verursachenden Zellwandsubstanzen ergeben, sei folgendes Modell (Abb. 27) vorgeschlagen:

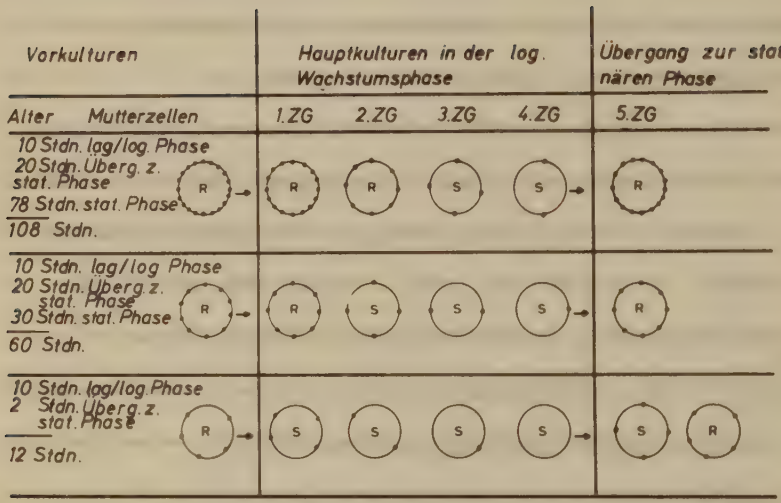

Abb. 27: Modell-Darstellung des Resistenzverlustes oder -gewinns von Zellen gegenüber dem Schneckenenzym in Abhängigkeit vom Alter der Vorkultur.
Die dunklen Punkte sollen Substanzen (Mannan und Glucan (Polysaccharide) sowie Proteine) in der Zellwand darstellen, die vom Schneckenenzym nicht angreifbar sind und in bestimmten Mengen die Resistenz verursachen. In diesem Modell wird angenommen, daß 5 und mehr Punkte zu einer Resistenz führen und, daß die Menge der Substanzen während der log. Wachstumsphase von Zellgeneration zu Zellgeneration jeweils halbiert wird.

ZG = Zellgeneration,
R = resistente Zellen,
S = sensible, vom Schneckenenzym angreifbare Zellen, aus denen sich Protoplasten entwickeln können.

In diesem Modell sind auch die von NORTHCOTE u. HORNE (1952) erzielten Resultate, daß die Zellwand sich chemisch hauptsächlich aus Mannan und Glucan zusammensetzt und weitere über die Zellwandkomponente vorliegende Veröffentlichungen [8] berücksichtigt. Diese Veröffentlichungen beziehen sich vor allem darauf, daß die Zellwand überwiegend aus Polysacchariden und Proteinen besteht.

Hierbei ist besonders zu beachten, daß ANDERSON und MILLBANK (1966) bei ihren Untersuchungen feststellten, daß die Zellwände, die vom Schneckenenzym nicht angreifbar waren, einen höheren Mannangehalt aufwiesen. Aus dem Vorhandensein von Zellwänden, die vom Schneckenenzym angreifbar waren und Zellwänden, die sich dem Schneckenenzym gegenüber resistent verhielten, folgerten sie, daß sich das Mannan in seiner Natur unterscheidet.

Die Proteine der Zellwände werden, wie aus weitergehenden Untersuchungen hervorging, während der logarithmischen Wachstumsphase infolge der Enzymeinwirkung völlig, in der stationären Wachstumsphase nur zu 20 % abgebaut. Hieraus wurde entnommen, daß auch die Art der Proteine in den Zellwänden verschieden ist.

Auch muß das Verhältnis zwischen Mannan und Glucan, das von den jeweiligen Wachstumsverhältnissen abhängig ist (CHUNG u. NICKERSON 1954), insofern berücksichtigt werden, als hierdurch möglicherweise die die Resistenz verursachenden Substanzen im Verlauf der Vermehrung abgebaut und durch andere ersetzt werden, die vom Schneckenenzym angreifbar sind.

---

8) NORTHCOTE (1954), CHUNG u. NICKERSON (1954), FALCONE u. NICKERSON (1956), EDDY (1958), KORN u. NORTHCOTE (1960), sowie ANDERSON u. MILLBANK (1966).

Zu den aus der Abb. 27, S. 72, ersichtlichen dunklen Punkten sei bemerkt, daß diese die in der Zellwand vorhandenen Substanzen darstellen sollen, die vom Schneckenenzym nicht angreifbar sind und in bestimmten Mengen die Resistenz bewirken. Bei diesen Substanzen handelt es sich um vom Enzym nicht angreifbare Polysaccharide und Proteine [9]. Zellen einer älteren Vorkultur enthalten mehr Substanzen, die nicht vom Schneckenenzym angreifbar sind. Ein progressiver Abbau dieser die Resistenz verursachenden Substanzen erfolgt innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase im Verlauf von mehreren Zellgenerationen. Erst während des Übergangs von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase ist wieder eine Zunahme der Resistenz zu verzeichnen. Ein Vergleich der in Abb. 27 unter a, b und c innerhalb der log. Wachstumsphase gebildeten vier Zellgenerationen zeigt, daß bei Verwendung einer älteren (108 Stdn.) Vorkultur (a) erst von der 3. Zellgeneration an protoplastenbildungsfähige Zellen entstehen können. Wird eine 60 Stdn. alte Vorkultur (b) verwandt, können bereits aus Zellen der 2. Generation Protoplasten gewonnen werden. Bei Verwendung einer relativ jungen Vorkultur (c), die sich nur 2 Stdn. im Übergang von der log. zur stationären Wachstumsphase befindet, können aus allen Zellgenerationen der log. Wachstumsphase und auch aus einem Teil der im Übergang von der log. zur stationären Wachstumsphase entstehenden Generation protoplastenbildungsfähige Zellen gewonnen werden.

Die bessere Eignung jüngerer Vorkulturen und die Bedeutung der logarithmischen Wachstumsphase läßt sich hieraus einwandfrei erkennen.

---

9) MILLBANK u. MACRAE (1964), ANDERSON u. MILLBANK (1966).

Ergänzend sei hier hinzugefügt, daß durch eine Verlängerung der logarithmischen Wachstumsphase, die beliebig variiert werden kann (Kapitel 2.3.1.1), die Möglichkeit besteht, eine größere Anzahl von resistenzfreien Zellgenerationen zu gewinnen und damit die Häufigkeit der Protoplastenbildung erheblich zu steigern.

4.5 Das Nährmedium

Aus den Untersuchungsergebnissen (Kapitel 3.1.5.1), daß Zellen, die in einem HE-Medium, das nur 0,125 % Glucose oder keine Glucose, jedoch einen Zusatz von 0,5 % Aethanol enthielt, aufwuchsen, nicht zur Bildung von Protoplasten fähig waren, muß geschlossen werden, daß die Glucose und damit das Nährmedium einen Einfluß auf die chemische Zusammensetzung der Zellwand hat [10]. Der mangelnde Glucosegehalt verursacht demzufolge eine Resistenz gegenüber dem Schneckenenzym. Diese Aussage gilt auch für das Ergebnis des mit Aethanol ohne Glucose durchgeführten Versuchs. Die sich ständig verringernde Protoplastenbildung beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase ist somit auf den Verbrauch von Glucose und nicht auf die Ansammlung von Alkohol zurückzuführen. Dieser Befund schließt die Veratmung von Alkohol in Gegenwart von Glucose aus und bestätigt die Untersuchungsbefunde von POHLIT u.a. (1966). Nach deren Feststellungen wird Alkohol erst nach dem Verbrauch von Glucose als Kohlenstoffquelle veratmet.

---

10) Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kamen DUNWELL, AHMAD u. ROSE (1961), die berichteten, daß der Polysaccharidanteil der Hefezellwand entsprechend dem vorhandenen Nährstoff variiert.

Nach meiner Auffassung hätte die Veratmung von Alkohol in Gegenwart von Glucose die Bildung resistenter Zellen zur Folge.

Daß die Verringerung der Häufigkeit der Protoplastenbildung vor allem auf den Zellwandeigenschaften der während des Glucosemangels gebildeten Zellen beruht, geht auch aus den Untersuchungsergebnissen in Kapitel 3.1.5.2 hervor. Hierdurch erwies sich, daß eine 2-stündige Unterbrechung des Stoffwechsels[11] die Protoplastenbildungsfähigkeit in Glucosegegenwart gebildeter Zellen nicht beeinträchtigt (Abb. 17). Eine Veränderung der vom Schneckenenzym angreifbaren Zellwandeigenschaften wird durch die Stoffwechselruhe offenbar nicht bewirkt.

Der Befund von MÜLLER (1965), daß die Zellwände der Sproßknospen und unfertigen Tochterzellen dem Schneckenenzym gegenüber resistent sind, ist nach meinen Beobachtungen darauf zurückzuführen, daß Zellen aus einer Kultur verwendet wurden, die sich bei eintretendem Glucosemangel im Übergang zur stationären Wachstumsphase befand. Der weitgehende Verbrauch von Glucose in dieser Phase wirkt sich vermutlich auf die Zellwandkomponente der Tochterzellen aus. Eine Übertragung dieser Zellen in ein frisches HE-Medium bewirkt bei der nächsten Zellgeneration durch die milieubedingte, veränderte chemische Zusammensetzung der Zellwand wiederum eine Sensibilität gegenüber dem Schneckenenzym.

---

11) Aufbewahrung nach Suspendierung im Phosphatpuffer im Brut- oder Kühlraum bei 30 ° C oder 4 ° C.

4.6 Protoplasten oder Sphäroplasten

Wie bereits einleitend berichtet wurde, ist für Protoplasten und Sphäroplasten, also Zellabkömmlingen, die völlig oder weitgehend frei von Zellwandmaterial sind, das Zerplatzen nach der Wasserzugabe charakteristisch. Ob die von mir gewonnenen Protoplasten noch mit Zellwandresten behaftet sind, war nicht Gegenstand meiner Untersuchungen.

Meine Beobachtungen, insbesondere über die nach dem Platzen der Protoplasten entstehenden unterschiedlichen Formen, veranlassen jedoch, diese Frage eingehend zu diskutieren. Diese Beobachtungen sind in Abb. 7 schematisch dargestellt und lassen erkennen, daß sich die Protoplasten nach der Wasserzugabe gleichmäßig vergrößern und platzen. Die nach dem Platzen entstehenden Gebilde weisen verschiedene Umrisse auf. Die in Abb. 7 mit A bezeichnete Form wird überwiegend und vor allem bei Verwendung jüngerer Vor- und Hauptkulturen beobachtet. Die Form B ist hauptsächlich bei Verwendung älterer Vor- und Hauptkulturen festzustellen, so daß hier ein Kausalzusammenhang angenommen werden kann.

Das einseitige Platzen der Form B läßt das Vorhandensein von Zellwandresten vermuten. In diesem Zusammenhang sei auf die Berichte von NECAS (1965 a) und OTTOLENGHI (1966) hingewiesen. Den Angaben von NECAS zufolge soll die Synthese der Zellwand die Voraussetzung für die Bildung von Knospen sein. OTTOLENGHI warf auf Grund seiner Beobachtungen die Frage auf, ob die bei Protoplasten beobachtete Neubildung der Zellwand vielleicht nur dann möglich sei, wenn noch Reste der alten vorhanden sind. Gestützt auf das Vorbringen dieser beiden Autoren ist anzunehmen, daß die Koloniebildungsfähigkeit der

Sphäroplasten größer ist als die der Protoplasten. Diese Feststellung konnte von mir nicht gemacht werden (vgl. Abb. 25).

4.7 Diskussion zur Regeneration von Protoplasten

Nachdem die Versuche, Protoplasten mit Hilfe des Schneckenenzyms herzustellen, erfolgreich verlaufen sind, und es außerdem gelang, die Protoplastenbildung entscheidend beeinflussende Faktoren zu erkennen, interessierte es festzustellen, ob die so hergestellten Protoplasten auch zur Regeneration fähig sind.

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß die Protoplasten nach der Zellwandverdauung sehr empfindlich gegenüber osmotischer Änderung oder mechanischem Druck sind, und die Stabilisation der Protoplasten nur mit Hilfe eines geeigneten Stabilisators möglich ist; infolgedessen ist für die Regeneration der Protoplasten ein geeignetes Milieu, das die Lyse während der Regeneration verhindert, unbedingt erforderlich.

Es erwies sich, daß Protoplasten weder in flüssigem HE-Medium noch in flüssigem HE-Medium mit einem Zusatz von $(NH_4)_2SO_4$ (Endkonz. = 0,6 m) oder $MgSO_4$ (Endkonz. = 1,2 m) wachstums- und regenerationsfähig sind. Auch konnte von mir weder ein begrenztes Wachstum ohne Regeneration (NECAS und SVOBODA 1965) noch das von EDDY und WILLIAMSON (1959) in flüssigem Nährmedium festgestellte große Streckungs- und Vergrößerungsvermögen beobachtet werden. So war ebenfalls bei Verwendung von flüssigem Nährmedium mit 10 %iger Gelatine bei 30 ^{o} C eine Stabilisation der Protoplasten nicht festzustellen (ROST und VENNER 1965).

Die Protoplasten platzten während der Vergrößerung und Streckung. Erst der

Zusatz von Ammonium- oder Magnesiumsulfat zum Lösungsmittel für das verwendete Nährmedium plus 10 %iger Gelatine führten bei 30 ° C zu einer Stabilisation. Die Protoplasten streckten und vergrößerten sich dann, ohne die Bildung von normalen Hefezellen zur Folge zu haben, jedoch waren bei 25 °C etwa 10 % zur Bildung von Kolonien fähig (Abb. 25).

Die Befähigung der Protoplasten zur Bildung intakter Hefezellen in einem Nährmedium mit hochprozentiger Gelatine unter Berücksichtigung der Temperatur wurde schon von NECAS (1961) sowie NECAS und SVOBODA (1965) beobachtet. Später berichteten auch SVOBODA (1965) sowie ROST u. VENNER (1965), daß die Regeneration der Hefeprotoplasten nur bei einem 30 %igen Gelatinegehalt möglich sei [12].

Nach meinen Befunden ist ebenfalls mit 30 %iger Gelatine und bei 25 ° C die optimale Regeneration der Protoplasten zu erzielen; es konnten jedoch mit 20 %iger Gelatine noch mehr als 30 % und mit 10 %iger Gelatine mehr als 10 % der Protoplasten regenerieren (Abb. 25).

Aufgrund dieser Beobachtungen ist zu folgern, daß zur Regeneration der Protoplasten nicht nur die Gelatinekonzentration und die Temperatur wesentlich sind, sondern auch das Lösungsmittel, das im Zusammenwirken mit der Temperatur die Gelatine beeinflußt.

Hieraus ist zu schließen, daß das Wachstum und die Regeneration der Protoplasten weitgehend von den physikalischen Eigenschaften der Gelatine abhängig sind. Diese Auffassung stimmt mit den Ansichten von NECAS u. SVOBODA (1965) sowie ROST u. VENNER (1965) überein. Auch wird hiermit die Abnahme

---

12) Nach den Angaben von SVOBODA regenerierten hier die Protoplasten bei Temperaturen von 22 - 25° C, der Mitteilung von ROST und VENNER zufolge bei 24 ° C.

der Regenerationsrate bei Erhöhung der Gelatinekonzentration auf 40 % zu erklären sein, da durch die erhöhte Konzentration die Festigkeit des Nährsubstrates gesteigert wird und die empfindlichen Protoplasten nicht in die Gelatine einsinken und damit den erforderlichen Schutz finden können. So wurde von mir mikroskopisch beobachtet, daß die auf der Oberfläche eines festen Nährmediums befindlichen Protoplasten lysieren.

Die Gelatine vermindert bei geeigneter Konzentration (etwa 30 %) und geeigneter Temperatur (25 °C) sowie bei Anwesenheit eines geeigneten Stabilisators erheblich die Streckung und Vergrößerung der Protoplasten und übernimmt somit, wenn auch in begrenztem Umfange, Funktionen der Zellwand. Durch die so erzielte Begrenzung der Vergrößerung und Streckung wird vermutlich eine Synthese der Zellwand begünstigt. Diese Vermutung wird durch die Feststellung gestützt, daß mit 30 %iger Gelatine stabilisierte Protoplasten schneller normale Zellen bilden als die mit 20 oder 10 %iger Gelatine stabilisierten Protoplasten. Sie wird weiter gestützt durch die Angaben von NECAS (1965 a), denen zufolge sich die Regeneration in folgenden Phasen vollziehen soll:

1. Wachstum von Protoplasten,
2. Synthese der Zellwände,
3. Bildung von Knospen.

So soll auch nach den Beobachtungen von SVOBODA (1965) ein Nährmedium mit hochprozentiger Gelatine die Synthese von Mannan begünstigen. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Untersuchungsergebnisse von EDDY u. WILLIAMSON (1959) an Saccharomyces carlsbergensis und NECAS (1965 a) an Saccharomyces cerevisiae hingewiesen, nach denen die Protoplasten in flüssigem und festem Medium ein System von Fibrillen aufbauen sollen. KOPECKA, CTVRTNICEK u. NECAS

(1965) berichten, daß in einem Gelatinemedium [13] wachsende Protoplasten fähig sind, komplette Zellwände zu synthetisieren.

Das bereits geschilderte Unvermögen, Protoplasten in flüssigem Nährmedium bei 30 ° C zu stabilisieren, kann nach den vorangegangenen Ausführungen auf die im Verhältnis zur Zellwandsynthese schnellere Streckung zurückzuführen sein, die letztlich zum Platzen der Protoplasten führt. Es ist denkbar, daß die von anderen Autoren bei Verwendung von flüssigem Nährmedium erzielten unterschiedlichen Befunde auch von der jeweiligen Zusammensetzung des Nährmediums und dem Alter der verwendeten Kulturen abhängig sind.

Die von mir beobachteten mehrgestaltigen Entwicklungsformen der einzelnen Protoplasten (Abb. 18 -21) müssen nicht allein durch die Faktoren Gelatinekonzentration und Temperatur sowie Lösungsmittel bedingt sein, sondern können ihre Ursache möglicherweise auch in dem unterschiedlichen Alter der verwendeten Zellen haben. Es bilden z.B. Zellen von jüngeren Vor- und Hauptkulturen Protoplasten mit größerem Streckungs- und Vergrößerungsvermögen (Kapitel 3.3.1.2). Das im Gegensatz hierzu geringere Streckungs- und Vergrößerungsvermögen bei Verwendung älterer Kulturen läßt auf eine eventuell hierdurch bedingte unterschiedliche Elastizität der einzelnen Protoplasten schließen. Ob noch Reste der Zellwand vorhanden sind, die hier unter Umständen die Vergrößerung und Streckung beeinträchtigen, wurde nicht untersucht.

Aus den Abb. 18 - 21 und der schematischen Darstellung Abb. 22 sind die beobachteten verschiedenartigen Entwicklungsformen der Protoplasten bei der Regeneration erkennbar.

---

13) Über die Konzentration des Mediums wurden keine Angaben gemacht.

Neben der Elastizität der einzelnen Protoplasten und deren Streckungs- und Vergrößerungsvermögen könnten die vorgenannten Befunde auch auf den möglichen Verlust eines für die Größe und Form verantwortlichen Regulationsmechanismus zurückzuführen sein, der sich erst wieder mit der Bildung von Knospen entwikkelt.

Ferner ist zu bemerken, daß die von HOLTER u. OTTOLENGHI (1960) beobachtete Sporenbildung von Protoplasten, und die darüberhinaus von EDDY u. WILLIAMSON (1959) erwähnte Bildung vegetativer Zellen aus diesen Sporen von mir nicht festgestellt werden konnte.

Abschließend möchte ich auf die Angaben von ROST u. VENNER (1965) hinweisen, daß aus Protoplasten entstehende intakte Zellen sich weder morphologisch noch physiologisch von den normalen unterscheiden. Diese Angaben können durch meine Befunde bestätigt werden. Auch in meinen Versuchen wuchsen die regenerierten Zellen in flüssigem und festem Nährmedium ohne Unterschied im Vergleich zum Ausgangsmaterial.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es gelang, Hefeprotoplasten von Zellen haploider, diploider und tetraploider Stämme von Saccharomyces in unterschiedlichen Mengen durch die Behandlung mit Schneckenenzym herzustellen, ohne daß dabei Unterschiede zwischen den Zellen verschiedenen Ploidiegrades, die weitestgehend isogen und homozygot sind, auftraten.

Hierbei wurden die Einflüsse verschiedener Stabilisatoren, Enzymkonzentrationen und deren Einwirkungszeiten sowie die Temperaturabhängigkeit geprüft. $MgSO_4$ erwies sich gegenüber $(NH_4)_2SO_4$ als der am besten geeignete Stabilisator.

Die erhaltenen Befunde lassen erkennen, daß die Häufigkeit der Bildung von Protoplasten in direktem Zusammenhang mit dem Alter der Zellkultur und dem Glucosegehalt des Anzuchtmediums steht.

Zellen, die in einem Nährmedium wuchsen, das Glucose nur in geringfügigen Mengen enthielt oder dem statt Glucose Aethanol als Kohlenstoffquelle zugesetzt war, bildeten keine Protoplasten.

Zwischen Änderungen des pH-Wertes des Kulturmediums und der Bildung von Protoplasten wurde kein Zusammenhang festgestellt.

Bei den erzielten Protoplasten wurde eine unterschiedliche Befähigung zur Bildung vegetativer Zellen (Regeneration) festgestellt.

Neben dem Alter der Zellkultur, aus der die Protoplasten gewonnen wurden, wirkten sich die Gelatinekonzentration und deren Lösungsmittel sowie die Temperatur auf die Regeneration aus.

Es wurden überwiegend vier morphologisch deutlich unterscheidbare Entwicklungsreihen beobachtet. Zwei davon führten zur Bildung von vegetativen Zellen. Eine Bildung vegetativer Zellen ist in den übrigen beiden Entwicklungsreihen zwar nicht beobachtet worden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Anhand der bis jetzt vorliegenden Befunde wurde ein Modell aufgestellt, das die Resistenz der Zellwand dem Schneckenenzym gegenüber veranschaulicht.

Die bei der Herstellung von Protoplasten erzielten Resultate und mögliche Ursachen der unterschiedlichen Entwicklungstendenzen der Protoplasten bei der Regeneration wurden diskutiert.

Ein Zeitrafferfilm über die Bildung und Regeneration von Protoplasten wurde aufgenommen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, F.B. and J.W. MILLBANK (1966): Protoplast formation and yeast cell-wall structure. The action of the enzyms of the snail, Helix pomatia. Biochem. J. 99, 682 - 687

BLOEMERS, H.P.J. and V.V. KONINGSBERGER (1967): Uptake of large molecular weight radioactive RNA by protoplasts of Saccharomyces carlsbergensis. Nature 214, 487 - 488

CHUNG, C.W. and W.J. NICKERSON (1954): Polysaccharide Syntheses in growing yeasts. J.biol.Chem. 208, 395 - 407

CIRILLO, V.P. (1962): Sugar transport by Saccharomyces cerevisiae protoplasts. J.Bact. 84, 1251 - 1253

DUELL, E.,S. INOUE and M.UTTER (1964): Isolation and properties of intact mitochondria from spheroplasts of yeast. J.Bact. 88 , 1762 - 1773

DUNWELL, J.L., F. AHMAD and A.H. ROSE (1961): Changes in the polysaccharide composition of yeast resulting from biotin deficiency. Biochem.biophys. Acta 51, 604

EDDY, A.A and D.H. WILLIAMSON (1957): A method of isolating protoplasts from yeast. Nature 179, 1252 - 1253

EDDY, A.A. (1958): Aspects of the chemical composition of yeast. Proc.roy.Soc. (London), Ser.B, 149, 425 - 440

EDDY, A.A. and D.H. WILLIAMSON (1959): Formation of aberrant cell walls and of spores by the growing yeast protoplast.
Nature 183, 1101 - 1104

FALCONE, G. and W.J. NICKERSON (1956): Cell-wall mannan-protein of Baker's yeast.
Science 124, 272 - 273

FREY-WYSSLING, A. (1967): Gymnoplast instead of Protoplasts.
Nature 216, 516

GARCIA-ACHA, F., LOPEZ-BELMONTE and J.R. VILLANUEVA (1967): Vacuoles of fungal protoplasts.
Canad. J. Microbiol. 13, 433 - 437

GASCON, S., A. GARCIA OCHOA, M. NOVAES and J.R. VILLANUEVA (1965): Lytic action of strepzymes from Micromonospora AS.
Arch. Mikrobiol. 51, 156 - 167

GIAJA, J. (1914): Sur l'action de quelques ferments sur les hydrates de carbone de la levure.
Comp. rend. soc. biol. 77, 2 - 4

GIAJA, J. (1919): Emploi des ferments dans les etudes de physiologie cellulaire.
Comp. rend. soc. biol. 82, 719 - 720

GIAJA, J. (1922): Sur la levure d'epouillee de membrane.
Comp. rend. soc. biol. 86, 708 - 709

HEINE, B. (1967): Cytologische Untersuchungen an Hefen unter besonderer Berücksichtigung der peripheren Zellanteile.
Promotionsarbeit, Freie Universität Berlin

HOLDEN, M. and M.V. TRACEY (1950): A study of enzymes that can break down tobacco-leaf components.
1. Digestive juice of Helix on defined substrates.
Biochem. J. 47, 407 - 414

HOLTER, H. and P. OTTOLENGHI (1960): Observation on yeast protoplasts.
Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 31, 409 - 422

KESSLER, G. and W.J.NICKERSON (1959): Glucomannan-protein complexes from cell walls of yeast.
J.biol. Chem. 234, 2281 - 2290

KOPECKA, M., O.CTVRTNICEK and O.NECAS (1965): Formation and properties of fibrillar network formed in yeast protoplasts as the first step of biosynthesis of cell wall.
Symposium über Hefe-Protoplasten, S. 73 - 75, Jena, Akademie-Verlag, Berlin 1967.

KORN, E.D. and D.H. NORTHCOTE (1960): Physical and chemical properties of polysaccharides and glyco-proteins of the yeast-cell-wall. Biochem. J. 75, 12 - 17

KOTYK, A. (1965): Sugar space in yeast cells and protoplasts.
Symposium über Hefe-Protoplasten, S. 161 - 162, Jena, Akademie-Verlag, Berlin 1967

LASKOWSKI, W. (1960): Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. I. Aufbau homozygoter Stämme und Dosiseffektkurven für ionisierende Strahlen, UV und organische Peroxyde.
Z. Naturforschg. 15b, 495 - 506

LASKOWSKI, W. (1962 a): VI. Über den Aufbau weitgehend isogener, homozygoter penta- und hexaploider Stämme sowie den Einfluß bestimmter mutierter Allele auf die Strahlenresistenz.
Z. Naturforschg. 17b, 93 - 108

MILLBANK, J.W. and R.M.MACRAE (1964): Degradation of yeast cell wall by fractionated snail gut enzyme.
Nature, 201, 1347

MÜLLER, R. (1965): Mikroskopische Analyse der Protoplastenentstehung und -reversion.
Symposium über Hefe-Protoplasten, S. 37-41, Jena, Akademie-Verlag, Berlin 1967

NECAS, O. (1956 a): Vitality of cell fragments of yeasts, IV. Relation of the nucleus to growth ability. Folia biol. 2, 29

NECAS, O. (1959): Nuclear structure of growing naked protoplasts of yeasts.
Nature 184, 1664 - 1665

NECAS, O. (1960): The structure of the nuclei of growing naked yeast protoplasts. Folia biol. 6, 233 - 238

NECAS, O. et.al. (1961): Division of the nuclei of naked yeast protoplasts.
Folia biol. 7, 202

NECAS, O. (1961): Physical conditions as important factors for the regeneration of naked yeast protoplasts.
Nature 192, 580 - 581

NECAS, O. (1965 a): The mechanism of regeneration of yeast protoplasts. II. Formation of the cell wall de novo.
Folia biol. 11, 97 - 102

NECAS, O. and M. HAVELKOVA (1965): Electron microscopy of the yeast protoplasts and their growing forms.
Symposium über Hefe-Protoplasten, S. 55 - 58, Jena, Akademie-Verlag, Berlin 1967.

NECAS, O. and A.SVOBODA (1965): Relation between the biosynthesis of the wall and regeneration in yeast protoplasts.
Symposium über Hefe-Protoplasten, S. 67 - 71, Jena, Akademie-Verlag, Berlin 1967.

NORTHCOTE, D.H. and R.W.HORNE (1952): The chemical composition and structure of the yeast cell wall.
Biochem. J. 51, 232 - 236

NORTHCOTE, D.H. (1954): Polysaccharides of the yeast cell.
J.gen.Microbiol. 11, viii - ix

NURMINEN, T., E. OURA and H. SUOMALAINEN (1965): Preparation of protoplasts from Baker's yeast.
Suomen Kemistilehti 38, 282 - 285

OHNISHI, T. and B. HAGIHARA (1965): Some properties of mitochrondria prepared from yeast protoplasts. Symposium über Hefe-Protoplasten, S. 185 - 188, Jena, Akademie-Verlag, Berlin 1967.

OTTOLENGHI, P. (1966): Do yeasts form true protoplasts?
Comp.Rend.Trav.Lab. Carlsberg 35, 363 - 368

POHLIT, W.,W. LASKOWSKI and E.R.LOCHMANN (1966): VIII. Untersuchungen zum Kohlenstoff-Stoffwechsel unbestrahlter Zellen.
Z.Naturforschg. 21 b, 1089 - 1096

RETEL, J. and R.J. PLANTA (1967): Ribosomal Precursor RNA in Saccharomyces carlsbergensis.
European J.Biochem. 3, 248 - 258

RODRIGUEZ AGUIRRE, M.J. and J.R.VILLANÜEVA (1962): Production of protoplasts. Like structure from varions species fungi.
Nature 196, 693 - 694

ROST, K. und H.VENNER (1964): Isolierung und Untersuchung von Desoxyribonucleinsäure aus Hefen.
Hobby-Seylers Z.f.physiologische Chemie 339, 230 - 237

ROST, K. und H. VENNER (1965): Enzymatische Zellwand Verdauung bei Hefen durch Schneckenenzym.
Arch. Mikrobiol. 51, 122 - 129

ROST, K. und H.VENNER (1965): Wachstum von Hefeprotoplasten und ihre Reversion zu intakten Hefezellen.
Arch. Mikrobiol. 51, 130 - 139

ROZIJN, Th. H., and G.J.M.TONINO (1964): Studies on the yeast nucleus. I. the isolation of nuclei.
Biochem. biophys. Acta 91, 105 - 112

SUGAWARA, S. (1966): Spheroplast from Candida albican.
Nature 212, 92 - 93

SUOMALAINEN, H., T. NURMINEN and E.OURA (1966): Preparation of mitochondria from yeast protoplasts.
Federation of European Biochemical Societies, Third Meeting, Warsaw 1966, Abstr. Commun. p. 161

SVIHLA, G., F. SCHLENK and J.L.DAINKO (1961): Spheroplasts of the yeast Candida utilis.
J. Bact. 82, 808 - 814

SVOBODA, A. (1965): Regeneration ability of protoplasts of different yeast species. Symposium Über Hefe-Protoplasten, S. 31-35, Jena, Akademie-Verlag, Berlin 1967.

UHL, A. (1960): Die Bedeutung des pH-Wertes der Nährlösung. "Die Hefen", Bd. 1, S. 247, Verlag Hans Carl, Nürnberg

ZVJAGILSKAJA, R.A. und T.P.AFANASJEWA (1965): Die Isolierung und Fraktionierung der Protoplasten aus Hefezellen von Endomyces magnusii.
Symposium über Hefe-Protoplasten, S. 27 - 29, Jena, Akademie-Verlag, Berlin 1967.

Die in der vorliegenden Arbeit wiedergegebenen Untersuchungen wurden in der Zeit vom Wintersemester 1966 zum Sommersemester 1968 am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. W. Stein) durchgeführt.

Für das Thema und die ständige Förderung der Arbeit, für zahlreiche Anregungen sowie für vielfältig gewährte Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. W. Laskowski vielmals.

Danken möchte ich auch Frau M. Siewert, den Herren G. Bjeske, I. Lamprecht, Priv.-Doz. Dr. E.-R. Lochmann und vor allem Herrn D. Averbeck für die ständige Hilfsbereitschaft.

LEBENSLAUF

Am 5. 12. 1936 wurde ich, Majdi Shahin, als Sohn des Rechtsanwaltes und Hochschullehrers Mousa Shahin und seiner Ehefrau Mariam in Jerusalem / Palästina geboren.

Von 1943 an besuchte ich die Schule, zuletzt die amerikanische Friends Boys School in Ramallah / Jordanien, die ich im Juli 1956 mit dem Reifezeugnis verließ.

Am 13. 4. 1959 wurde ich an der Freien Universität Berlin für die Fachrichtung Biologie immatrikuliert. Hier bestand ich am 27. 11. 1962 die Vorprüfung zur Diplomprüfung und am 15. 7. 1965 die Diplomprüfung in Biologie.

Seit Oktober 1966 bin ich Doktorand und wurde im Januar 1968 wissenschaftlicher Hilfsassistent am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin.

Das Thema der vorliegenden Arbeit erhielt ich im Oktober 1966 von Herrn Prof. Dr. W. Laskowski.

LEBENSLAUF